

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Biyolojik Sıvılarda Klozapin Ölçümü İçin LC-MS/MS Yöntem  
Kurulması**

**Karam Mazin Kamil GHARAB**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

**KONYA-2018**

**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyolojik Sıvılarda Klozapin Ölçümü İçin LC-MS/MS Yöntem  
Kurulması**

**Karam Mazin Kamil GHARAB**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

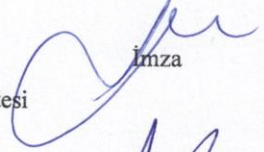
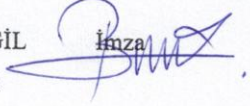
**Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Koordinatörlüğü tarafından  
17202068 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2018**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Karam Mazin Kamil GHARAB tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

|                         |                                    |                                                                                              |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jüri Başkanı (Danışman) | Prof. Dr. Ali ÜNLÜ                 | <br>İmza  |
|                         | Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  |                                                                                              |
| Üye                     | Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU            | <br>İmza  |
|                         | Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  |                                                                                              |
| Üye:                    | Dr. Öğr. Üyesi Beyza SARAÇLIGİL    | <br>İmza |
|                         | Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi |                                                                                              |

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ender ERDOĞAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübeleri, yol göstericiliği ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Eğitimime olan katkılarından, her zaman sağladığı motivasyon ve hoşgöründen dolayı sayın Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA hocama teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE'ye eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük bir keyif aldığım her zaman yanımda olan ve destek veren, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum çok değerli arkadaşlarım Mohammed BİK, Oğuzhan TOK ve Dugyu ERYAVUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, sabrını hiç esirgemeyen sevgili eşim ve tüm geniş aileme de teşekkürü borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

|                                               |     |
|-----------------------------------------------|-----|
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR                             | i   |
| İÇİNDEKİLER                                   | ii  |
| KISALTMALAR                                   | iv  |
| ÖZET                                          | v   |
| ABSTRACT                                      | vii |
| 1. GİRİŞ VE AMAC                              | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER                             | 4   |
| 2.1. Anti-Psikotik İlaçları                   | 4   |
| 2.1.1. Anti-Psikotik İlaçları Nedir Ve Tarihi | 4   |
| 2.1.2. Antipsikotikler Sınıflandırılması      | 5   |
| 2.1.3. Antipsikotiklerin Farmakokinetiği      | 5   |
| 2.1.4. Antipsikotikler Etki Mekanizması       | 6   |
| 2.1.5. Anti-Psikotik İlaçları Yan Etkileri    | 7   |
| 2.2. Klozapin                                 | 8   |
| 2.2.1. Klozapin Nedir Ve Tarihi               | 8   |
| 2.2.2. Klozapin Metabolizması                 | 9   |
| 2.2.3. Klozapin Etki Mekanizması              | 11  |
| 2.2.4. Klozapin Kullanımı ve Yan Etkisi       | 11  |
| 2.2.5. Klozapin'in Kanda ki Konstrasyonu      | 12  |
| 2.3. Şizofreni                                | 12  |
| 2.3.1. Şizofreni Nedir                        | 12  |
| 2.3.2. Şizofreni Semptomları                  | 13  |
| 2.3.3. Şizofreni Epidemisi                    | 13  |
| 2.4. Metot Validasyonu                        | 14  |
| 2.4.1. Validasyon                             | 14  |
| 2.4.2. Doğruluk                               | 15  |
| 2.4.3. Analitik Aralık (Linearity)            | 15  |
| 2.4.4. Analitik Ölçüm Limitleri               | 15  |
| 2.4.4.1. Limit Of Dedection (LOD)             | 15  |
| 2.4.4.2. Limit Of Quantitation (LOQ)          | 15  |
| 2.4.5. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)          | 15  |
| 2.4.6. Geri Kazanımı                          | 15  |
| 2.4.7. İnterferans (Girişim)                  | 16  |
| 2.4.8. Taşıma (Carryover)                     | 16  |
| 2.4.9. Matriks Etkisi                         | 16  |
| 3. MATERYAL VE METOD                          | 17  |
| 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar       | 17  |
| 3.1.1. Cihazlar                               | 17  |
| 3.1.2. Kimyasallar                            | 17  |
| 3.2. LC-MS/MS                                 | 17  |
| 3.2.1. Metot Optimizasyonu                    | 17  |
| 3.2.2. LC-MS/MS Parametreleri                 | 19  |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3. Akış Gradienti -----                                          | 20        |
| 3.2.4. Elde Edilen Pikler -----                                      | 21        |
| 3.2.5. Çalışma Prosedürü -----                                       | 21        |
| <b>3.3. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması -----</b> | <b>22</b> |
| 3.3.1. Standartların Hazırlanması -----                              | 22        |
| 3.3.2. İnternal Standart Hazırlama Prosedürü -----                   | 22        |
| <b>3.4. Metot Validasyonu -----</b>                                  | <b>22</b> |
| 3.4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması -----                       | 22        |
| 3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri -----                                | 22        |
| 3.4.2.1. Limit Of Detection (LOD) -----                              | 23        |
| 3.4.2.2. Limit Of Quantitation (LOQ) -----                           | 23        |
| 3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması -----                 | 23        |
| 3.4.4. Geri Elde Çalışması -----                                     | 23        |
| 3.4.5. İnterferans Çalışması -----                                   | 24        |
| 3.4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması -----                            | 24        |
| 3.4.7. Numune Stabilite Çalışması -----                              | 25        |
| 3.4.8. Dondurma Ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi -----             | 25        |
| 3.4.9. Matrex Etkisi Çalışması -----                                 | 25        |
| <b>4. BULGULAR -----</b>                                             | <b>27</b> |
| 4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması -----                         | 27        |
| 4.2. Analitik ölçüm limitleri -----                                  | 29        |
| 4.2.2. Limit of Detection -----                                      | 29        |
| 4.2.3. Limit of Quantitation -----                                   | 29        |
| 4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması -----                   | 30        |
| 4.3.1. Klozapin Çalışma İçi Çalışması -----                          | 30        |
| 4.3.2. Klozapin Gün İçi Çalışma Arası Çalışması -----                | 32        |
| 4.3.3. Klozapin Günler Arası Çalışması -----                         | 34        |
| 4.4. Geri Kazanımı Çalışması -----                                   | 36        |
| 4.5. İnterferans Çalışması -----                                     | 37        |
| 4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması -----                              | 38        |
| 4.7. Numune Stabilite Çalışması -----                                | 39        |
| 4.8. Dondurma Çözme Etkisi Çalışması -----                           | 39        |
| 4.9. Matriks Etkisi Çalışması -----                                  | 40        |
| <b>5. TARTIŞMA -----</b>                                             | <b>41</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER -----</b>                                    | <b>43</b> |
| <b>KAYNAKÇA -----</b>                                                | <b>44</b> |
| <b>EKLER -----</b>                                                   | <b>46</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ -----</b>                                                | <b>47</b> |

## KISALTMALAR

|                 |                                                                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>CLZ</b>      | Klozapin                                                            |
| <b>TDM</b>      | Terapötik İlaç İzleme                                               |
| <b>WBC</b>      | Lökosit Sayısı                                                      |
| <b>ANC</b>      | Mutlak Nötrofil Sayısı                                              |
| <b>PDA</b>      | Fotodiyoderay Dedektörü                                             |
| <b>FGA</b>      | First Generation Antipsichotics                                     |
| <b>SGA</b>      | Second Nesil Antipsikotikler                                        |
| <b>TD</b>       | Tardif Diskineziyi                                                  |
| <b>SSS</b>      | Santral Sinir Sistemine                                             |
| <b>PCP</b>      | Phencyclidine                                                       |
| <b>EPS</b>      | Ekstrapiramidal Semptomları                                         |
| <b>HPLC:</b>    | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                             |
| <b>HPLC-ECD</b> | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektrokimyasal<br>Detektör |
| <b>HPLC-UV</b>  | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- UV detektörü               |
| <b>HPLC-DAD</b> | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diode array<br>Detection    |
| <b>LC-MS:</b>   | Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi                           |
| <b>GC:</b>      | Gaz Kromatografisi                                                  |
| <b>GC-MS:</b>   | Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi                            |
| <b>ESI:</b>     | Elektro Sprey İyonizasyon                                           |
| <b>ISO</b>      | International Organization For Standardization                      |
| <b>LOD:</b>     | Limit Of Detection                                                  |
| <b>LOQ:</b>     | Limit Of Quantitation                                               |
| <b>CV:</b>      | Coefficient Of Variation                                            |
| <b>CLSI:</b>    | Clinical Laboratory Standard Institute                              |
| <b>MRM:</b>     | Multiple-Reaction-Monitoring                                        |
| <b>SD:</b>      | Standart Sapma                                                      |

# ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## Biyolojik Sıvılarda Klozapin Ölçümü İçin LC-MS/MS Yöntem Kurulması

Karam Mazin Kamil GHARAB

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2018

Bir dibenzodiazepin türevi olan Klozapin, 1970'lerde ilk atipik (ikinci nesil) antipsikotik olarak tanıtıldı. Şizofreninin pozitif ve negatif bulgularının tedavisinde en etkili ilaçlardan biri olarak görülmekte ve pratik olarak ekstrapiramidal semptomlar göstermemektedir. Klozapin, beyindeki çeşitli nörotransmitter reseptörleri ile etkileşen karmaşık bir farmakolojik profile sahiptir. Tam etki mekanizması bilinmemek ama dopaminerjik ve serotonerjik etkilerin bir kombinasyonu olduğu düşünülmektedir (Auwärter, 2011).

Klozapin, tedaviye dirençli şizofrenide benzersiz bir şekilde etkilidir, şizofrenili ağır hasta / refrakter hastalarda etkinliğine ek olarak, Klozapin'in tekrarlayan intihar davranışı riskini azalttığı literatürde gösterilmiştir (Flanagan., 2013).

Atipik (ikinci nesil) antipsikotiklerin terapötik ilaç izleme (TDM), bağımlık değerlendirmeye, dozajı optimize etmeye, toksisite riskini en aza indirmeye ve olası ilaç-ilaç etkileşimlerini araştırmaya yardımcı olabilir (Danielle S. Fisher, 2013).

Klinisyenlere karşı olan zorluk, ilaç metabolizmasındaki değişkenlikler nedeniyle serum Klozapin düzeylerinin dozaj kullanarak yeterince kontrol edilememesidir. Yakın tarihli bir araştırmada, klinisyenlere doz ayarlamaları için gereken zamanında bilgileri sağlamak için serum düzeyleri bakım noktasında (POC) hızlı bir şekilde ölçülebiliyorsa, Klozapinin daha geniş bir şekilde reçete edilebileceğini göstermektedir (Mijeong Kanga, 2017).

Klozapin şizofreninin tedavisinde kurulduğundan beri HPLC-UV, HPLC-DAD CE-DAD, GC-MS, LC-MS VE LC-MS / MS e elektrokimyasal yöntemleri kullanılarak çeşitli analitik yöntemler yayınlanmıştır (Auwärter, 2011).

Çalışmamızda Klozapin analizinde LC-MS/MS yönteminin metot validasyonu CLSI kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Metot validasyon parametreleri kapsamında linearite, analitik ölçüm limitleri, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, taşıma, interferans, numune satabilitesi, matriks etkisi, dondurma-çözmenin etkisi çalışmaları yapıldı.

Linearite çalışmasında metodumuz 1250 ve 1.2 µg/L aralığında lineer olarak bulunmuştu. Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen Klozapin %CV'leri kabul edilebilir düzeylerdedir. İnterferans çalışmasında elde edilen % biaslar düşük sayılmaktadır. Klozapin için geri elde çalışmasında 625 µg/L'lik %97.76 ve 250 µg/L'lik %97.11 olarak bulunmuştur, kantitasyon limiti 2.4 µg/L, dedeksiyon limiti 0.6 µg/L olarak belirlenmişti.

**Anahtar kelimeler:** Klozapin, Şizofreni, LC-MS/MS, Metot Vlidasyonu



# **ABSTRACT**

T.C.

SELCUK UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

## **Establishing a Method for Clozapine measurement In Biological Fluids By LC-MS/MS**

**Karam Mazin Kamil GHARAB**

**Department Of Medical Biochemistry**

**MASTER'S THESIS / KONYA-2018**

Clozapine atypical (second generation) antipsychotics, dibenzodiazepine derivative, was introduced as the first atypical antipsychotic in the 1970s. It is still regarded as one of the most effective medications for the treatment of both positive and negative signs of schizophrenia while showing practically no extrapyramidal symptoms. The exact mechanism of action remains unknown but is assumed to be a combination of dopaminergic and serotonergic effects (Auwärter, 2011).

Clozapine is uniquely effective in treatment-resistant schizophrenia, In addition to its efficacy in severely ill/refractory patients with schizophrenia, clozapine has been demonstrated to reduce the risk of recurrent suicidal behavior (Flanagan., 2013).

Therapeutic drug monitoring (TDM) of atypical (second generation) antipsychotics can help assess adherence, optimise dosage, minimise the risk of toxicity, and help investigate possible drug-drug interactions (Danielle S. Fisher, 2013).

The difficulty with clinicians is that serum clozapine levels cannot be adequately controlled by dosing due to variations in drug metabolism. A recent study shows that clozapine can be prescribed more widely if serum levels can be measured quickly at the point of care (POC) to provide timely information for dose adjustments to clinicians (Mijeong Kanga, 2017).

Since the time clozapine was established in therapy of schizophrenia several analytical methods using HPLC-UV, HPLC-DAD CE-DAD, GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS and electrochemical methods have been published (Auwärter, 2011).

In our study, method validation of clozapine in LC-MS / MS analysis was performed according to CLSI rules. Linearity, limits of analytical measurement, reproducibility, recovery, carryover, interference, matrix effects, sample stability and the effect of freezing- resolving were carried out within the method validation parameters.

In the linearity, our method was found to be linear between 1250 and 1.2 µg/L. Clozapine% CVs obtained from the reproducibility study are acceptable. The % biases of interference obtained are considered low. In the recovery study of clozapine 625 µg/L 97.76% and 250 µg/L 97.11% was found. the quantitation limit was 2.4 µg / L and the detection limit was 0.6 µg / L.

**Key Words:** Clozapine, Schizophrenia, LC-MS/MS, Method Validation

## 1. GİRİŞ VE AMAC

Şizofreni en ciddi psikiyatrik bozukluklardan biridir. Çoğunlukla yaşları 15 ile 30 arasında, kronik hastalık öncelikle negatif ve kognitif semptomlar, buna karşın akut tekrarlamalar, sanrılar gibi pozitif psikotik belirtilerin alevlenmesinden kaynaklanmaktadır (KIM T. MUESER, 2011).

Bir dibenzodiazepin türevi olan Klozapin (CLZ), 1970'lerde ilk atipik (ikinci nesil) antipsikotik olarak kullanılmaya başlandı. Şizofreninin pozitif ve negatif bulgularının tedavisinde en etkili ilaçlardan biri olarak görülmekte ve pratik olarak ekstrapiramidal semptomlar göstermemektedir. Klozapin beyindeki çeşitli nörotransmitter reseptörleri ile etkileşen karmaşık bir farmakolojik profile sahiptir. Tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte dopaminerjik ve serotonerjik etkilerin bir kombinasyonu şeklinde düşünülmektedir (Auwärter, 2011).

Klozapin tedaviye dirençli şizofrenide benzersiz bir şekilde etkilidir (Auwärter, 2011), şizofrenili ağır hasta/refrakter hastalarda etkinliğine ek olarak, Klozapin'in tekrarlayan intihar davranışı riskini azalttığı literatürde gösterilmiştir (KIM T. MUESER, 2011).

Ağız yolu ile uygulanan Klozapin, hepatik mikrozomal enzim sistemleri ile hayvanlarda ve insanlarda çeşitli metabolitlere metabolize olur. Bu metabolitlerden ikisi, N-desmetil Klozapin, Norklozapin ve Klozapin N-oksit önemli dolaşımdaki metabolitlerdir, her ikisi de Klozapin'den farmakolojik olarak daha az aktiftir.

Atipik (ikinci nesil) antipsikotiklerin terapötik ilaç izleme (TDM), bağımlık değerlendirmeye, dozajı optimize etmeye, toksisite riskini en aza indirmeye ve olası ilaç-ilaç etkileşimlerini araştırmaya yardımcı olabilir (Danielle S. Fisher, 2013).

Klinisyenlerin pratikte en sık karşılaştıkları zorluk, ilaç metabolizmasındaki değişkenlikler nedeniyle serum Klozapin düzeylerinin dozaj kullanarak yeterince kontrol edilememesidir. Yakın tarihli bir araştırmada, klinisyenlere doz ayarlamaları için gereken zamanında bilgileri sağlamak için serum düzeyleri bakım noktasında hızlı bir şekilde ölçülebiliyorsa, Klozapinnin daha geniş bir şekilde reçete edilebileceğini göstermektedir (Mijeong Kanga, 2017).

Zehirlenme vakalarında, Klorapin plazma konsantrasyonları, mililitredeki mikrogramlara yükselebilir. Çocuklarda ve yetişkinlerde, ölümcül olmayan ve ölümcül, kazara veya kasıtlı birçok Klorapin zehirlenmesi eski çalışmalarda açıklanmıştır. Ayrıca Klorapin doz bağımlı epileptik nöbetlere neden olabilir (Auwrter, 2011).

Nadir fakat ciddi hematolojik etkiler (Agranülositoz veya Granülositopeni) potansiyeli nedeniyle, bireylerin Klorapin tedavisini sürdürdüğü sürece hematolojik durumu sürekli izlemek gerekmektedir. Klorapin tedavisinin ilk 6 ayı için hematolojik durumu (lökosit sayısı [WBC] ve mutlak nötrofil sayısı [ANC]) haftalık olarak izlemek gerekmektedir (KIM T. MUESER, 2011).

şizofreni semptomlarının tedavisinde antipsikotik ilaçların plazma düzeyinde izlenmesinde, flupenazin ile RIA ve haloperidoln HPLC-ECD ile saptanması gibi birçok durumda kullanılmıştır. Klorapin durumunda, gaz kromatografisi, radyoimmunoassay, HPLC-UV ve GC-MS ile analiz de dahil olmak üzere Klorapin'in bir veya her iki ana metabolitinin belirlenmesi için sınırlı duyarlılık ve özgünlüğe sahip birkaç analitik yöntem bildirilmiştir. Gaz kromatografisi ve GC-MS yöntemleri Klorapin-n-oksit deneyi için uygun olmayabilir, çünkü Klorapin-N-oksit termal olarak kararsızdır ve yüksek sıcaklık içeren deneysel koşullar altında parçalanır. Klorapin-N-oksit de dahil olmak üzere ancak sınırlı hassasiyet ve uzun analiz süresi ile Klorapin ve mtabolitleri test etmek için HPLC-UV yöntemi ve fotodiyoderay dedektörü (PDA) bulunan HPLC gibi daha hafif deneysel koşullardaki yöntemler kullanılmıştır. Klorapin, NOR-Klorapin ve Klorapin-N-Oksidi eşzamanlı olarak belirlemek için ilk kez geliştirilen spesifik ve duyarlı bir sıvı kromatografi-elektrosprey tandem kütle spektrometresi (LC-MS-MS) metodunu tanımlamaktadır. LC-MS/MS metodu, photodiodearray dedektörü (PDA) ile mevcut HPLC yöntemine kıyasla gelişmiş özgüllük, hassaslık ve daha kısa numune analiz zamanı göstermiştir. Bu LC-MS/MS yöntemi, şizofrenide Klorapin ile tedavi edilen hastalarda plazma seviyesinin izlenmesi için kullanılmaktadır (Auwrter, 2011).

Klorapin ruh sağlığı ve hastalıkları kliniklerinde kullanılmaktadır. Ruh sağlığı anabilim dalı ğretim yeleri tarafından Klorapin düzey ölçümleri talep edilmekte ve düzey ölçümünün önemli olduğu ilaç grubuna girdiği bilinmektedir. İlaç düzeyi ölçümünde hassasiyet çok önemli olduğundan kullandığımız yöntemin

spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olmalıdır. Analitik interferansın azaltılması, doğruluğun arttırılması ve analiz süresinin kısaltılması amacıyla serum Klozapin düzeylerinin ölçümü için, Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS)'te yeni bir ölçüm metodu geliştirerek, rutin ölçümlerde kullanmayı planlamaktayız.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Anti-Psikotik İlaçları**

#### **2.1.1. Anti-Psikotik İlaçları Nedir Ve Tarihi**

Anti-psikotik ilaçları (nöroleptikler), şizofreni, diğer psikozların ve ajitasyon durumlarının tedavisinde etkilidir. Eski antipsikotikler ilaçları, dopamin 2'ye daha yüksek affinite sahip iken, yeni nesil antipsikotikler ilaçları, serotonin 5-HT<sub>2</sub> ye daha büyük affinite sahiptir.

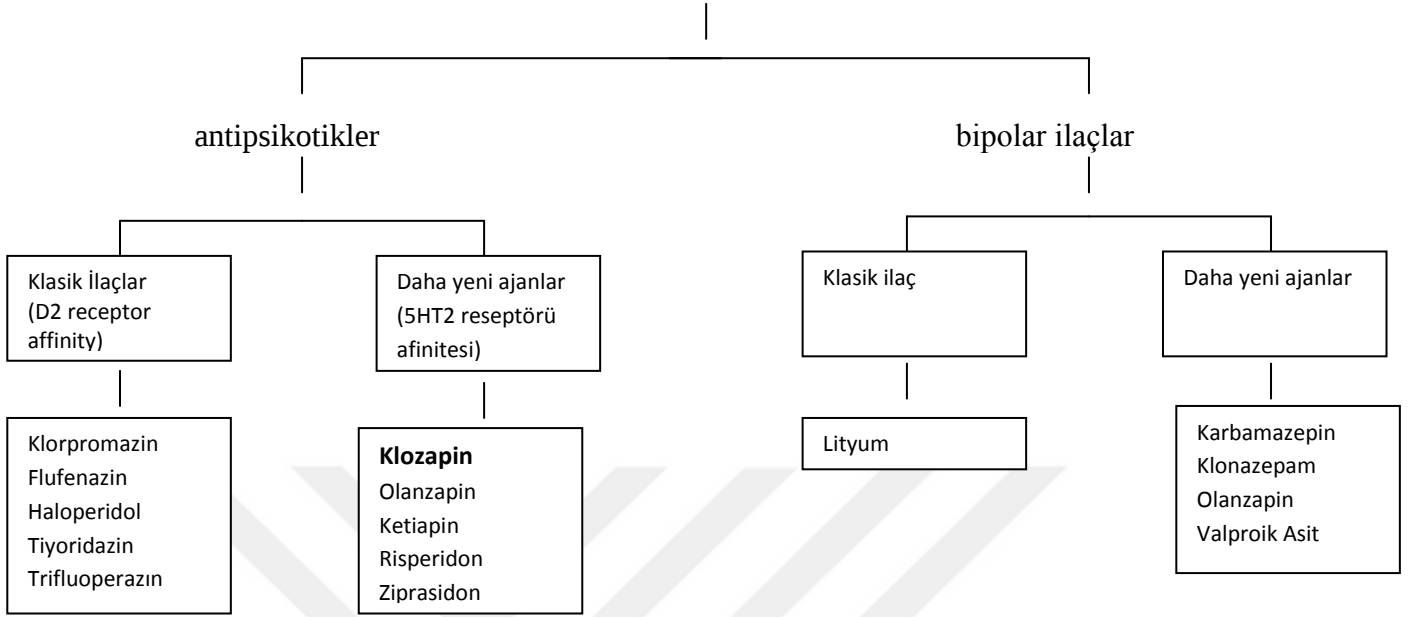
İlk antipsikotik klorpromazin, 1950'lerde geliştirilmiştir. Daha sonra, etki mekanizmalarında ve yan etki profillerinde benzerlikleri paylaşan diğer antipsikotikler geliştirilmiştir. Klorpromazin, Tioridazin, Perfenazin, Molindon, Tiyotiken, Pimozid, Fluphenazin ve Haloperidol şu anda "birinci nesil antipsikotikler" (first generation antipsychotics, FGA'lar) olarak nitelendirilen ilaçlardır. Bu ilaç sınıfının alternatif isimleri arasında "nöroleptikler" ve "tipik" antipsikotikler yer alır. Postsinaptik D2 dopamin reseptör antagonizmasını inhibe eder ve böylece presinaptik dopaminerjik nöronlar tarafından salınan endojen dopaminin etkisini azaltır.

Atipik antipsikotik olarak da bilinen ikinci nesil antipsikotikler (SGA'lar) , benzer bir etki mekanizması ile antipsikotik etkilerini uyguladığına inanılmaktadır, ancak FGA'lardan farklı yan etkiler üreten reseptör etkinlik profillerine sahiptirler. SGA'lerden ilk olarak Klozapin, sonra Risperidon, Olanzapin, Ketiapin, Ziprasidon ve Aripiprazol geliştirilmiştir.

FGA'ların, şizofreninin negatif semptomlarını daha da kötüleştirdiği (veya en azından geliştirmede) ve tardif diskineziyi (TD) içeren ekstrapiramidal semptomlara neden olduğu bilinirken, SGA'ların negatif semptomları tedavi etmede ve hareket bozukluklarına neden olma ihtimalinin daha düşük olduğu ümit edilmektedir.

Daha sonra SGA'ların şizofreninin negatif belirtilerini kötüleştirmede ve TD'ye yakalanma riskinin daha düşük olduğu ispatlanmıştır.

## Psikoz ve bipolar bozukluklar için kullanılan ilaçlar



### 2.1.2. Antipsikotikler Sınıflandırılması

- ❖ Seçici dopamin reseptör blokajı ile antipsikotikler (D1, D2 ve D3 antagonistleri )
- ❖ Kısmi D2 reseptör agonistleri
- ❖ Nondopaminerjik antipsikotikler
  - Serotonin (5HT) ajanları
  - Glutamat agonistleri
  - Gaba-A/benzodiazepin agonistleri
- ❖ D2 + diğer reseptörleri bloke eden antipsikotikler
  - 5HT2 + D2 antagonistleri
  - 5HT2 + D2 + alfa, antagonistleri
  - 5HT2 + DT + D2 + alpha., antagonistleri ör; Klozapin

### 2.1.3. Antipsikotiklerin Farmakokinetiği

Antipsikotikler ilaçları ağız yoluyla verildiğinde iyi emilir, lipitte çözünenler oldukları için Santral sinir sistemine (SSS) ve diğer çoğu vücut dokusuna kolayca girer. Çoğu plazma proteinlere bağlanır ve günlük dozlamaya izin veren uzun plazma

yarılanma ömrüne sahiptir. Bu ilaçlar eliminasyon olmadan önce karaciğer enzimleri tarafından metaboliz olmaları gereklidir. Bazı durumlarda sitokrom P450 enzimlerini inhibe eden diğer ilaçlar antipsikotik ajanların yarı ömürlerini uzatabilir. Bazı ilaçların (örn., Fluphenazine, Haloperidol) hem tedavinin hızlı başlatılması hem depo tedavisi için mevcuttur.

#### **2.1.4. Antipsikotikler Etki Mekanizması**

İnsanlarda 5 çeşit dopamin reseptörü vardır. Tip 1 ve 5 yapı ve ilaç hassasiyetinde benzerdir ve bu 2 reseptöre "D1 benzeri" grup veya reseptör sınıfı denmektedir. Dopamin reseptörü tip 2, 3 ve 4 de yapısında benzerdir ve bu nedenle "D2-benzeri" grup olarak bir araya getirilmiştir. Dopamin reseptörleri 2, 3 ve 4, antipsikotik ilaçlara göre belirgin olarak farklı duyarlılıklara sahiptir. D1 gibi reseptörler sıklıkla antipsikotik ilaçların birincil hedefi olarak belirtilirken, 3 bulgu D1 benzeri reseptörlerin bu ilaçların terapötik etkisinde klinik olarak uygun olmadığını göstermektedir. Klozapin gibi bazı antipsikotik ilaçların tedavi dozları beyin dopamin D1 reseptörlerinin yaklaşık %36-59'unu işgal etse de, bu işgal edilen D1 reseptörlerinin Klozapin'in eşsiz özelliklerine katkıda bulunduğuna inanmak için halen geçerli bir neden yoktur (Philip Seeman, 2002).

Şizofreni dopamin hipotezi, bozukluğun beynin spesifik nöronal bölgelerindeki nörotransmitter dopaminin fonksiyonel aktivitesinin nispeten aşırı olması nedeniyle önerilmektedir. Bu hipotez birkaç gözlem üzerine kurulmuştur. Birincisi, birçok antipsikotik ilaç beyin dopamin reseptörünü (özellikle D2 reseptörlerini) bloke eder. İkincisi, dopamin agonist ilaçlar (örn., Amfetamin, Levodopa) şizofreniyi şiddetlendirir. Üçüncü olarak, tedavi görmeyen şizofreni bazı beyin bölgelerinde artmış yoğunluklu dopamin reseptörleri tespit edilmiştir. Şizofreni dopamin hipotezi tam olarak tatmin edici değildir; çünkü antipsikotik ilaçlar çoğu hastada kısmen etkilidir ve birçok etkili ilaç D2 reseptörüne kıyasla diğer reseptörler için daha yüksek afiniteye sahiptir. Phencyclidine (PCP) bir psikotik sendroma neden olur, ancak dopamin reseptörleri üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.

Yeni atipik antipsikotik ajanların çoğu, D2 reseptörüne kıyasla diğer reseptörler için daha yüksek afiniteye sahiptir. Örneğin, Alfa-Adrenoseptör blokaj etkisi birçok ilacın antipsikotik etkisi ile iyi ilişkilidir. Önemli D4 ve 5-HT2 reseptör bloke edici etkilere

sahip bir ilaç olan Klozapin, D2 reseptörleri için neredeyse hiç afiniteye sahip değildir. Yeni atipik ilaçların çoğunun (Örneğin, Olanzapin, Ketiapin Ve Risperidon) D2 ve diğer reseptörlerle etkileşime girebilmelerine rağmen 5-HT2A reseptörleri için de yüksek afinitesi vardır. Ziprasidon, D2, 5-HT2A VE 5-HT1D reseptörlerinde bir antagonisttir ve 5-HT1A reseptöründe bir agonisttir. Yeni antipsikotik ajan aripiprazol, D2 ve 5-HT1A reseptörlerinde kısmi bir agonist, 5-HT2A reseptörlerine de güçlü bir antagonisttir. Yeni antipsikotik ilaçların reseptör bağlanma özellikleri, şizofreninin doğasındaki dopamin hipotezine alternatif olarak bir serotonin hipotezine yol açmıştır. Atipik ilaçların çoğu standart ilaçlara göre daha az ekstrapiramidal işlev bozukluğuna neden olur (Anthony J. Trevor, 2015).

#### **2.1.5. Anti-Psikotik İlaçları Yan Etkileri**

Bazı insanlar ilaç almaya başladıklarında yan etkiler başlar. Çoğu yan etki birkaç günden sonra geçer. Diğer yan etkileri kalıcı olabilmekte ama bu yan etkiler çoğu zaman başarıyla yönetilebilir tipte olmaktadır. çoğu antipsikotiklerin sık görülen yan etkileri:

- ❖ Uyuşukluk
- ❖ Pozisyonları değiştirirken baş dönmesi
- ❖ Bulanık görüş
- ❖ Çarpıntı
- ❖ Güneşe duyarlılık
- ❖ Deri döküntüleri
- ❖ Kadınlar için regl sorunları

Atipik antipsikotik ilaçlar kilo alımına ve kişinin metabolizmasında değişikliklere neden olabilir. Bu durum kişinin kolesterolünü yükseltebilir ve diyabet olma riskini artırabilir. Atipik antipsikotik ilaç alan bir hastanın kilosu, kan glikoz seviyeleri ve lipid düzeyleri düzenli olarak izlenmelidir.

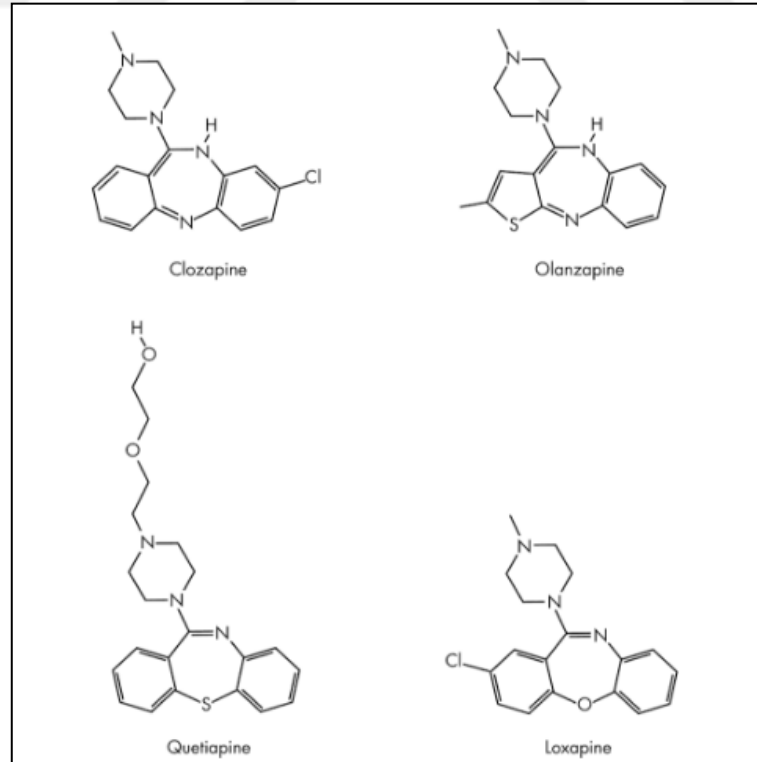
Klasik antipsikotik ilaçlar, aşağıdakiler gibi fiziksel hareketlerle ilgili yan etkilere neden olabilir:

- ❖ Katılık
- ❖ Kalıcı kas spazmları
- ❖ Titremeler
- ❖ Huzursuzluk (National Institute of Mental Health, 2016).

## 2.2. Klozapin

### 2.2.1. Klozapin Nedir Ve Tarihi

Klozapin veya 3-kloro-6-(4-metilpiper-azin-1-il)-5h-benzolb][1,4]benzodiazepin, dibenzepinler olarak bilinen trisiklik antipsikotik gruba aittir. Bu grup oksijen, nitrojen, karbon veya sülfür ile ikame edilmiş yedi üyeli dibenzazepin merkezi halka ile karakterizedir (Iskra ve decker 2012). Antipsikotik dibenzepinler, bir Loxapine benzeri bileşikler grubunu (dibenzoksazepinler) ve Klozapin benzeri bir grubu (dibenzodiazepinler) içerir. (Lindsley, 2013 Jul 17) Klozapin ve onun türevleri Olanzapin ve Ketiapin yapıları şekil 2.1'de görülebilir.



Şekil 2.1: Klozapin ve onun türevleri Olanzapin ve Ketiapin yapıları.

Klozapin , atipik antipsikotiklerin ana taşıdır. Tipik nöroleptik ajanlara kıyasla, serum prolaktin seviyelerini arttırmayan, şizofreni tedavisinde etkinliği, ekstrapiramidal semptomları (EPS) indüklemeye eğilimi düşük, özellikle tardif diskinezi gibi birçok eşsiz klinik avantaja sahiptir. Pozitif belirtilere etkili olmanın yanı sıra, Klozapin negatif belirtilerin tedavisinde faydalı olabilir. Şizofreniyle ilişkili intihar eğilimlerini ve bazı bilişsel açıkları önlemek için kanıtlanmıştır.

Bazı raporlar, Klozapin tedavisinin diğer nöroleptik ajanlar tarafından tetiklenen tardif diskinezinin diskinetik hareketlerini azalttığını önermektedir (M.C. Mauri, 2014).

Klozapin'in etkisi 1960'ların başında atipik antipsikotik olarak tanımlandı. Klozapin'in diğer antipsikotik ilaçları (örneğin "tipik" veya birinci jenerasyon ajanlar olarak tanımlanan Klorpromazin Ve Haloperidol, FGA'lar) kullanılan hastalarda oluşan ekstrapiramidal yan etkileri olmadığı için, avrupa marketinde şizofreni tedavisinde daha iyi tolere edilebilir kabul edilmiştir. Daha sonra finlandiyalı hastalarda oluşan agranülositoz raporları reçeteyi yazanlara büyük bir panik yarattı. 100 Klozapin alan hastalardan 17 vakada 8 ölüm gerçekleşmesi üzerine, Klozapin hemen 1976 de sandoz (üretici firma) tarafından piyasadan çekilmiştir (J., 2007 Mar).

Klozapin'in çekilmesinden 14 sene sonra ABD'de önemli bir çalışmanın sonuçlarında Klozapin'in klinik önemi keşfedilmiştir. Tedaviye yanıt veren ve şizofreninin pozitif ve negatif semptomlarındaki düzelmelerle birlikte, tedaviye dirençli hastalarda Klozapin, Klorpromazine üstünlük göstermiştir (Alessi-Severini, 2014).

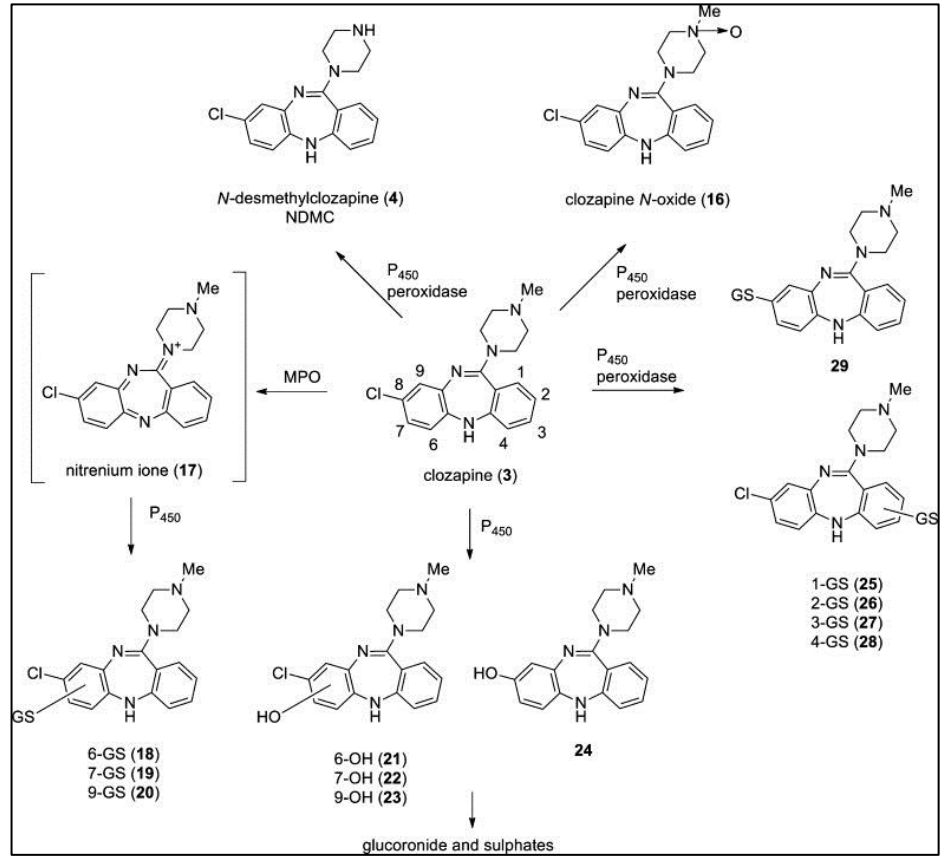
Klozapin ilk 1960 yılından avrupa'da 1975 yılına kadar kullanıldı, 1976 yılında gönüllü olarak geri çekildi ve 1989 yılında fda tarafından yeniden onaylandı (Lindsley, 2013 Jul 17).

### **2.2.2. Klozapin Metabolizması**

Klozapin, gıdasız olarak oral yoldan verildiğinde %90-95 oranında emilen iyi dağıtılmış bir SSS nüfuz eden bileşiktir. Buna rağmen, yüksek bir ilk geçiş etkisine bağlı olarak, mutlak oral biyoyararlılık sadece sınırlıdır. Klozapin plazma

proteinlerine düşük bağlanma gösterir ve oral dozdan yaklaşık 2 saat sonra pik plazma seviyeleri elde edilir. Klozapin'in eliminasyonu bifaziktir, kararlı durum elde edildikten yaklaşık 12 saat sonra bir terminal yarı ömrüne sahiptir (tipik olarak 7 günlük doz). Ayrıca, Klozapin CYP450 enzimleri (özellikle 1A2 VE 3A4) tarafından %80'i metabolize edilir, idrarda (%50) ve dışkıda (%30) metabolit olarak atılır (Lindsley, 2013 Jul 17).

Bu metabolitler, 4 ve 16-29, titizlikle karakterize edilmiştir. Metabolitlerin büyük çoğunluğu inaktiftir, fakat n-desmetil metabolit 4, NDMC aktiftir (vide infra) ve dolaşımdaki Klozapin'in dolaşım dozunun %10-90'ını oluşturabilir (Lindsley, 2013 Jul 17).



**Şekil 2.2:** Klozapin metabolizması.

Klozapin, ortalama yarı ömürleri 9.1 ile 17.4 saat arasında değişen geniş bir bireylerarası aralığı göstermektedir. Pik plazma yoğunluğuna ulaşma süresi 1,1 ile 3,6 saat arasında, plazma aralığı 8,7 ila 53,3 l / saat arasında ve dağıtım hacmi 1,6 ile 7,3 l / kg arasındadır. Düzenli plazma konsantrasyonlarına 7-10 günlük dozlardan

sonra ulaşılır. Klozapin plazma proteinlerine, esas olarak alfa-glikoproteine %95 bağlıdır (M.C. Mauri, 2014).

### **2.2.3. Klozapin Etki Mekanizması**

Klozapin, ilk ve bazı açılardan ikinci nesil antipsikotiklerin en etkili olanı D2 reseptörüne zayıf bir şekilde bağlanır (D3 VE D4 dopamin reseptörlerinde nispeten daha büyük antagonizma olmasına rağmen). 5HT2A ve 5HT2C reseptörleri için orta derecede afiniteye sahiptir. Diğer antipsikotikler efektif olmazken Klozapin genellikle etkilidir ve şizofreni ya da şizoaffektif bozukluğu olan hastalarda antisüisidal etkisi olduğu görülmektedir.

Tresadern ve arkadaşları (2011) 1800'den kilogramdan fazla Klozapini incelediler ve artan hidrofilisite, artan azot atomu sayısı, daha düşük molekül ağırlığı, daha az halka, daha az kiral merkezler ve artan kısmi pozitif yükün hepsinin D reseptöründen ayrışmaya katkıda bulunduğunu keşfettiler. Klozapin'in, D2 reseptörlerine %50 bağlanması için 1 dakikadan daha kısa bir hızlı ayrışma süresine sahip bir dopamin tip 2 (D2) reseptör antagonisti olduğu bilinmektedir. (Seeman, 2014 ) Klozapin, D2 reseptöründen daha güçlü 20'den fazla reseptöre bağlanır ve 5-HT2a'dan aynı veya daha kuvvetli olarak en az dört reseptöre bağlanır (Lindsley, 2013 Jul 17).

### **2.2.4. Klozapin Kullanımı ve Yan Etkisi**

Klozapin kullanımı agranülositoz riski nedeniyle, öncelikle en az iki antipsikotik tedaviye (örneğin Olanzapin) yeterince cevap veremeyen şizofren ve şizoaffektif hastalar için uygulanmaktadır.

Bununla birlikte, beyaz hücre sayımını izlemek için sıkı izleme ve başlangıçta haftalık ve daha sonra iki haftada bir kan alınması gerekir.

Klozapin ayrıca artmış nöbet riski, nadir miyokardit, eozinofili, antikolinerjik ve antihistaminik etkiler, ortostasis, kilo alımı ve ters metabolik etkileri içeren diğer birçok yan etkilere neden olabilir.

SGA'lar arasında, Klozapin ve Olanzapin, olumsuz metabolik etkilere neden olma olasılığı en yüksektir. Klozapin'in metabolik yan etkileri; kilo alımı,

hiperglisemi, diyabet (kilo alımı olup veya olmadığı) ve hiperlipidemi şeklindedir (Stein, 2013).

#### **2.2.5. Klopabin'in Kanda ki Konstrasyonu**

Haring ve ark. Çok çeşitli günlük dozlar alan 148 hasta üzerinde (12.5-700 mg), çeşitli gruplardaki yüzdelik farklılıkları değerlendirmiştir. Araştırmacılar erkeklerle ilişkisi olan kadınlarda (100'de 69.3). Sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre (100'de 81,8) ve yaşlı hastalarda daha genç olanlara göre daha yüksek konsantrasyonları gözlemlemiştir.

Bazı maddeler sitokromun aktivitesini değiştirerek Klopabin'in metabolizmasını etkiler, başlıca CYP1A2 indüksiyonu yapan ilaçlar (örneğin Karbamazepin, Fenitoin Ve tütün) sitokromun indüksiyonu yoluyla Klopabin'in konsantrasyonunu azaltırken, eritromisin veya kafein gibi inhibitörler kan düzeyini artırır.

Ateşli solunum yolu enfeksiyonları, Klopabin konsantrasyonlarının iki kat artmasına neden olabilir.

Terapötik kılavuzlarda, Klopabin konsantrasyonunun, özellikle tedaviye zayıf yanıt verenlerde, işbirliği yapmayan hastalarda, toksisite riski olanlarda, önemli advers reaksiyonların (nöbetler vs) ortaya çıkması, karaciğer hastalığı veya diğer ilaçların ve uyarıcıların etkisi üzerine odaklanmasını önerilmektedir. Bu durumlarda, Klopabin'in terapötik ilaç takibi önemli klinik değere sahip olabilir.

### **2.3. Şizofreni**

#### **2.3.1. Şizofreni Nedir**

Şizofreni, bir kişinin nasıl düşündüğünü, hissettiğini ve hareket ettiğini etkileyen kronik ve şiddetli bir hastalıktır. Şizofreni diğer ruhsal bozukluklar kadar yaygın olmasa da, çok sakat bırakabilir. 1,000'inin yaklaşık 7 veya 8 kişinin yaşamı boyunca şizofreni olacaktır.

Şizofreni, cinsiyet, yer, sosyal sınıf veya cildin renginden bağımsız olarak tüm popülasyona dağıtılır (Andreasen, 1983).

### 2.3.2. Şizofreni Semptomları

Şizofreni hasta olan insanlar sesleri duyabilir veya orada olmayan şeyleri görebilirler. Başkalarının akıllarını okuduğuna, düşüncelerini kontrol ettiğine ya da onlara zarar vermeye çalıştıklarına inanabilirler.

Şizofreni, kadınlara göre biraz daha erkekleri etkilemektedir. Dünyadaki tüm etnik gruplarda görülmektedir. Halüsinasyonlar ve sanrılar gibi belirtiler genellikle 16 ila 30 yaşları arasında başlar. Erkekler semptomları kadınlardan biraz daha erken başlar. En sık olarak şizofreni, geç ergenlikte ve erken yetişkinlikte ortaya çıkar (Stein, 2013).

**Pozitif semptomlar:** aşağıdaki gibi normal işlevin çarpıklıkları veya aşırılıklarını içerir.

Halüsinasyonlar, sanrılar, düzensiz düşünce ve konuşma, ve uygunsuz etki. Genellikle halüsinasyonlar doğada işitseldir; nadiren görsel, dokunsal veya koku verici olabilirler. Delüzyonlar, olumsuz kanıtlara rağmen düzenlenen yanlış inançlardır ve kültürel normlarla tutarlı değildir. Tipler persekulasyon, referans, somatik, grandioz vb. İçermekte. Pozitif semptomlar genellikle tedaviye negatif semptomlardan daha duyarlıdır (Stein, 2013).

**Negative semptomlar:** normal davranışta azalma veya yokluğu içerir. Duygusal düzleştirme, konuşma ve dilin yoksullaşması, avolasyon, motivasyon, ilgisizlik, anhedoni ve sosyal izolasyon içerir (Stein, 2013).

### 2.3.3. Şizofreni Epidemisi

Şizofreni en sık görülen psikiyatrik bozukluklardan biridir ve dünya nüfusunun yaklaşık %1'i psikiyatri kliniklerindeki yatakların yarısından fazlasını işgal eden şiddetli semptomlardan katlanmaktadır.

Hastalık genel popülasyonun yüzde 1'inden daha azında görülür, ancak ebeveyn, erkek kardeş veya kızkardeşi gibi hastalıkla ilgili birinci dereceden akrabasına sahip kişilerin yüzde 10'unda görülür. Hastalıkla ikinci derece akrabaları (teyze, amca, babaanne veya anneannesi veya kuzenleri) olan insanlar da genel popülasyondan daha sık şizofreni gelişir.

Bilim adamları, birçok farklı genin şizofreni riskinin artmasına katkıda bulunduğuna, ancak tek bir genin kendi başına bozukluğa neden olmadığına inanmaktadır.

Şizofreninin yaşam boyu yaygınlığı genel popülasyonda% 0,5-1,5 arasındadır ve dünya çapında engelliliğin önde gelen on nedenlerinden biridir. Not olarak, 100 oranındaki bu oranın farklı tarihsel dönemlerde ve farklı kültürlerde dikkate değer ölçüde sabit olduğu görülmüştür. Yıllık insidansın 10,000'de 0,5 ila 5 arasında olduğu bildirilmiştir. Şizofreni başlangıcı genellikle 20-45 yaşları arasındadır. Çoğu zaman, bozukluğun seyri kroniktir ve kademeli, ilerleyici bir bozulma ile karakterizedir. Bununla birlikte, ilk şizofreni dönemini takiben hastaların %30-60'ında kısmi veya tam iyileşme olduğu bildirilmiştir. Şizofreni hastalarının yaklaşık %20-40'ı yaşamları boyunca en az bir kez intihar girişiminde bulunur ve yaklaşık %10-15'i intihar eder. Erkeklerde ve kadınlarda prevalans eşittir (Stein, 2013).

Şizofreni için aşağıdaki risk faktörleri bildirilmiştir:

- erkekler daha erken teşhis edilir (15-25 yaş arası erkekler, 25-35 yaş arası kadınlar)
- mevsimselliği: kış doğum fazlası
- şizoid ve şizotipal kişilik bozuklukları
- aile öyküsü şizofreni veya majör duygudurum bozuklukları
- yüksek düzeyde ifade edilmiş duyguları olan bir ailedir
- şizofreni kentsel alanlarda ve gelişmiş ülkelerde daha sık olma eğilimindedir.
- alt sosyoekonomik durum
- şizofreni yeni göçmenlerde daha sık görülmektedir (yoksunluk, göçün stresi riskini artırabilir) (Stein, 2013).

## **2.4. Metot Validasyonu**

**2.4.1. Validasyon (CLSI ve ISO):** bir işlem, süreç, sistem, donanım ya da yöntemin beklendiği şekilde çalıştığını ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya sürecidir.

#### **2.4.2. Doğruluk**

Bir analitin seviyesinin gerçek değere yakın olmasını ifade eder. Hata (bias) ise iki değer arasındaki farkı gösterir. Rastgele hata ve sistematik hataların toplamı, toplam hatayı oluşturmaktadır (Tietz, 2006). Doğruluk yöntem karşılaştırma, geri elde ve interferans çalışmaları ile saptanır.

#### **2.4.3. Analitik Aralık (Linearite)**

Örneğin tayininde hiç modifikasyon yapılmadan yöntemin doğru olarak ölçülebildiği konsantrasyon aralığıdır.

Linearite sınırları kalibrasyon eğrisi çizilerek saptanır. Bir metodun analitik aralığı % 95-99'un değerinde ölçebilmesidir (Tietz, 2006).

#### **2.4.4. Analitik Ölçüm Limitleri**

##### **2.4.4.1. Limit Of Dedection (LOD)**

En düşük saptanabilen analit miktarıdır (Tietz, 2006).

##### **2.4.4.2. Limit Of Quantitation (LOQ)**

Belli bir kesinlik ve doğruluk değerinde kantitatif olarak en küçük ölçülebilen analit miktarıdır (Tietz, 2006).

#### **2.4.5. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)**

Bir analitik yöntemin aynı numunenin ardışık analiz değerlerini aynı olarak analiz edebilme gücü, metodun kesinliğini gösterir (Tietz, 2006).

#### **2.4.6. Geri Kazanımı**

Bir analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen miktarda eklenen analiti doğru olarak ölçme kapasitesidir. Geri kazanım ölçümleri ile bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgi elde edilmiş olur. Çünkü içeriği bilinen örneğin matriksinde bulunan tüm bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğünü gösteririr (Tietz, 2006).

#### **2.4.7. İnterferans (Girişim)**

Analitten başka bir bileşiğin etkisi veya örneğin özelliği nedeniyle, ölçülen analit konsantrasyonunda klinik olarak anlamlı bir bias'ın oluşumudur. (Tietz, 2006) klinik anlamlılık: interferans oluşturan bir analitik etkinin, ne kadar büyüklükte olursa klinik olarak anlamlı olduğuna karar verilmelidir.

#### **2.4.8. Taşıma (Carryover)**

Otomatize çalışan sistemlerde önceki numuneden sonraki numuneye aktarım olup olmadığını, oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermek için yapılır. Yüksek ve düşük konsantrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutulur. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır.

#### **2.4.9. Matriks Etkisi**

Standart solüsyon içindeki analit ile plazma gibi biyolojik matriksteki aynı analitin LC-MS/MS analizlerinde farklı yanıtlar oluşturması şeklinde tanımlanmaktadır. Matriks etkisi eş zamanlı salınan endojen fosfolipitler ve pek çok farklı bileşikten kaynaklanmaktadır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

##### 3.1.1. Cihazlar

- Tandem MS (ABSCIEX API 3200) (Singapur)
- HPLC { (Shimadzu UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası) LC20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler) }(Japonya)
- Santrifüj (Beckman Coulter S1100 X-2212)
- Vortex (Dragon Lab, almanya)
- Evaporator (Teknosem Teb 40-Wel Wt, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)

##### 3.1.2. Kimyasallar

- Nitrojen tüpü (Habaş)
- HPLC kolonu (Phenomenex Luna 5u C18, 50x4.6mm, Part No: 00b-4041-E0)
- İnternal Standart {Asetaminofen (Parol)} Atabay Kimya San. Ve Tic. A.Ş.
- Asetonitril { Merck 2.5l (Lot: 1.00030.2500) Darmstadt, Almanya) }
- HPLC Grade Su {Chemsolute,(Bach No: Q2a085192a) Almanya) }
- Formik Asit {Hcooh}{Sigma Aldrich, Lot No: 81420 }
- Etil Acetat {Merck: 2,5l (Lot: 1.00868.2500 ) Darmstadt, Almanya) }
- NaOH {Merck: K40124804 919, Darmstadt, Almanya}
- Klozapin (Liponex by Novartis) 25 mg

#### 3.2. LC-MS/MS

##### 3.2.1. Metot Optimizasyonu

Çalışmada optimum parametreleri belirlemek için ve en yüksek intensiteye sahip pikleri elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Uygun mobil fazı belirlemek için çalışmamızda %100'lük metanol ile hazırlanan standartlar kullanılmıştır. İlk hazırladığımız mobil faz A %0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren % 100'lük asetonitril ile yapılmıştır. İkinci denememizde mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B % 0.1'lik

formik asit içeren %100'lük asetonitril ile yapılmıştır. Üçüncü denememiz izokratik olarak %0.1'lik formik asit içeren %50 su/asetonitril ile yapıldı. En iyi intensite; % 100 metanol ile çözülen standartların mobil faz A %0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük asetonitril ile elde edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız formik asitin sebebi ise iyonlaşmayı artırıcı etkisidir. Cihaz ayarlarını belirlemek üzere yapılan deneme çalışmalarında yukarda belirlediğimiz mobil faz A, mobil faz B ve metanol ile hazırlanan standartlar kullanılmıştır.

Cihaz ayarları ile ilgili olarak time denemeleri 50 milisaniye, 100 milisaniye, 150 milisaniye, 200 milisaniye; enjeksiyon volümünü belirlemek için 20 µl, 30 µl , 40 µl 50 µl ile; sıcaklık denemeleri 350°C, 400°C, 450°C, ile çalışmalar gerçekleştirildi. İonspray voltaj (IS) ile ilgili denemeler, 4000v, 4500v, 5000v ve 5500v ile gerçekleştirilmiştir.

Akış gradientini belirlemek için yaptığımız deneme çalışması Sonucunda total akış hızı 1ml/dk olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda total akışta pompa B'nin yüzdesini belirlemek için %50, %60 ve %70 ile deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda kullandığımız akış gradienti şekil 3.1'de verilmiştir.

Metanol ile hazırlanmış standart ile uygun gaz ayarları ve potansiyel ayarlarının çalışmaları deneyerek yapıldı. Gaz ayarları ve potansiyel ayarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Gerçekleştirilen deneme çalışmaları Sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde edilen koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

### 3.2.2. LC-MS/MS Parametreleri

Çalışmamızda kullandığımız LC-MS/MS parametreleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

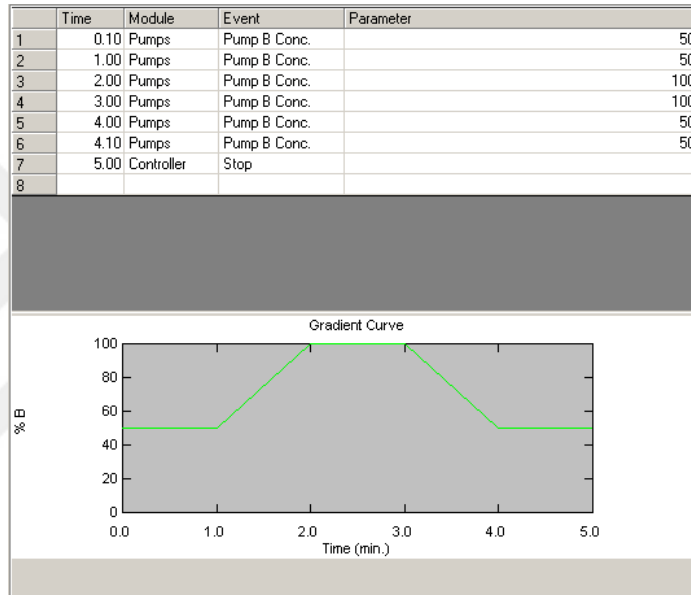
**Çizelge 3.1** LC-MS/MS parametreleri.

|                                     |                                                |
|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| Declustering potential (DP)         | 40                                             |
| Entrance potential                  | 10                                             |
| Collision energy (CE)               | 35                                             |
| Collision cell exit potential (CXP) | 4                                              |
| Curtain gas                         | 20                                             |
| Collision gas (CAD)                 | 6                                              |
| Ionspray voltage (IS)               | 5000 v                                         |
| Temperature (TEM)                   | 350°c                                          |
| Ion source gas1 (GS1)               | 40                                             |
| Ion source gas2 (GS2)               | 60                                             |
| Interface heater                    | Off                                            |
| Ionisation mode                     | Elektro sprey iyonizasyon                      |
| Ionisation source                   | Turbo sprey                                    |
| Collision gas                       | N <sub>2</sub>                                 |
| Dwell time                          | 100 milisaniye                                 |
| Pompa modu                          | Binary flow                                    |
| Total akış                          | 1 ml/dk                                        |
| Enjeksiyon volume                   | 40 µl                                          |
| Analiz süresi                       | 5 dk                                           |
| Kolon                               | HPLC kolonu (phenomenex luna 5u c18, 50x4.6mm) |
| Mobil faz A                         | % 0,1’lik formik asit içeren HPLC grade su     |
| Mobil faz B                         | % 0,1’lik formik asit içeren asetonitril       |

Klozapin standartları %100 metanolde çözdürüldü, Q<sub>1</sub> Ve Q<sub>3</sub> iyonlarının tayini Absciex API 3200 tandem mass spektrometri cihazında autotune algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. En yüksek intensiteye sahip Q<sub>1</sub> Ve Q<sub>3</sub> iyonları Klozapin için 327.100 ve 270.100 olarak belirlendi. İnternal standart (Asetaminofen) için ise en yüksek intensiteye sahip iyonlar (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>) 152.100-65.100 olarak belirlendi. Piklerin çıkış süresi Klozapin için: 0.95 dk'ydi.

### 3.2.3. Akış Gradienti

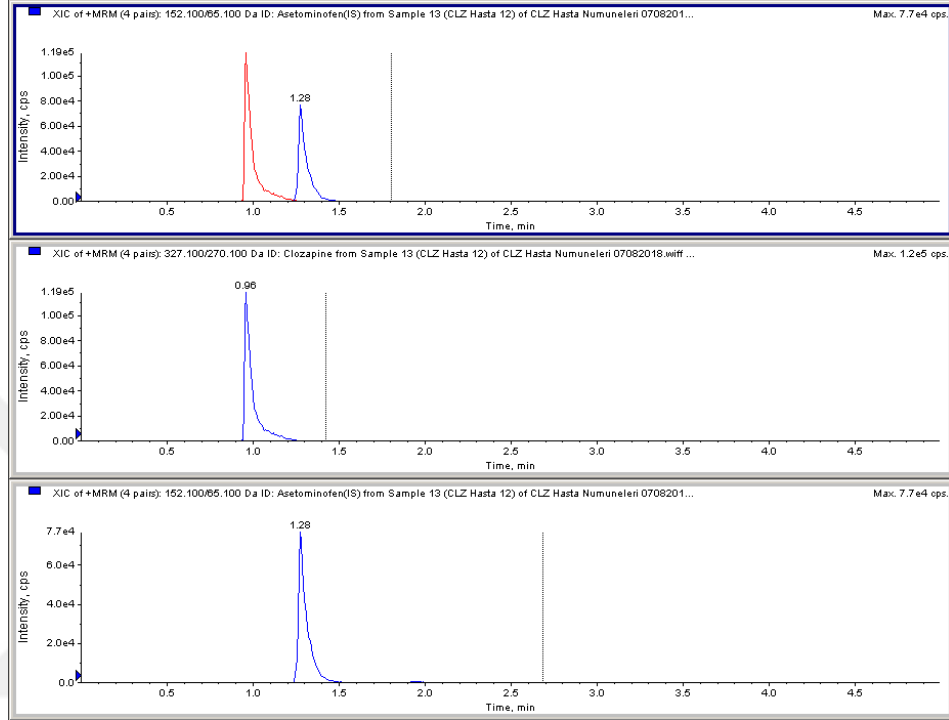
Çalışmamızda kullandığımız akış gradienti şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 akış gradienti.

### 3.2.4. Elde Edilen Pikler

Çalışmamızda elde ettiğimiz Klozapine ve internal standartına ait LC-MS/MS pikleri şekil 3.2’de gösterilmiştir. XIC OF +MRM (4 pairs): 327.100/270.100 da ID: clozapine from sample 13 (Klozapin hasta 12) of Klozapin hasta numuneleri.



Şekil 3.2 Klozapin ve internal standart (Asetaminofen) pikleri.

### 3.2.5. Çalışma Prosedürü

250 µl örnek ya da standart alınıp üzerine 250 µl internal standart eklendi, sonra 1 ml NaOH (pH 11-12) ve 1,5 ml Etil Asetat eklenerek 30 sn vortekslendi. 3500×rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz temiz bir tüpe alındı. Üst fazı alınmış tüpe tekrar 1,5 ml Etil Asetat ilave ederek tekrar 30 sn vortekslendi. 3500×rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bunun üst fazı da tekrar üst fazı alınan temiz tüpe ilave edildi. Azot gazı altında uçurularak kurutulan tüplere %50’lik asetonitrilden 200 µl ilave edilerek çözüldü. 190 µl viallere enjekte edilip, viallerin kapakları kapatılarak spore yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi.

### 3.3. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.1. Standartların Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan kolzapin standartları psikiyatrik bölümünden tablet olarak alınmıştır.

**Stok 1:** tablet haldeki Klozapin (25 mg) standartı 250 mg/L olacak şekilde %100 metanol ile çözülmüştür.

**Stok 2:** stok 1'den 1/10 dilüsyon yapılarak 25 mg/L = 25000 µg/L'lik standart elde edilmiştir.

**Stok 3:** stok 2'den 1/10 dilüsyon yapılarak 2500 µg/L'lik standart elde edilmiştir.

#### 3.3.2. İnternal Standart Hazırlama Prosedürü

Asetaminofen ana stoktan (10 mg/ml) 1/1000 dilüsyon yapılarak 10000 µg/L'lik standart elde edilmiştir.

### 3.4. Metot Validasyonu

#### 3.4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Metot validasyonu kapsamında gerçekleştirdiğimiz linearite çalışmaları CLSI EP6-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemek amaçlanmıştır.

Bu protokol doğrultusunda Klozapin için 25000 µg/L'den, 1250, 625, 312, 78, 39, 19, 9.7, 4.8 , 2.4 ve 1.2 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde linearite çalışmasında kullanılmak üzere serum ile seri dilüsyon yapılmıştır.

#### 3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri

Limitler CLSI EP17 protokolüne göre belirlenmiştir. (westgard ve ark, 2008).

#### **3.4.2.1. Limit Of Detection (LOD)**

Kromatografik yöntemlerde alt limitlerin sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi.

#### **3.4.2.2. Limit Of Quantitation (LOQ)**

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlendi.

#### **3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması**

Tekrarlanabilirlik çalışması CLSI EP5-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

CLSI EP5-A protokölüne uyularak gerçekleştirdiğimiz tekrarlanabilirlik çalışmasında Klorzapin için 625, 250 µg/L'lik serum havuzu ile çalışma içi (gün içi), gün içi çalışmalar arası 20 ölçüm çift çalışılarak, günler arası 5 ölçüm 4 gün boyunca çalışılarak tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.4. Geri Elde Çalışması**

Geri elde çalışmasında klorzapi için 625, 312, 156 µg/L'lik standartlar kullanıldı.

1. Tüpe 1000 µl serum havuzundan alındı.
2. Tüpe 625 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
3. Tüpe 312 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
4. Tüpe 156 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.

Ön işlemler tamamlanarak okutulmuştu ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplanmıştır.

### 3.4.5. İnterferans Çalışması

Klinik laboratuvarlarda interferans çalışmaları kapsamında gerçekleştirdiğimiz interferans çalışmaları CLSI EP7-A protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Klozapin için, Olanzapin ile interferans çalışması yapıldı. Olanzapin'den 100-2000 µg/L'lik konsantrasyonlar kullanıldı.

Düşük ve yüksek düzeylerde olmak üzere iki serum havuzu elde edilmiştir. İnterferan madde eklemek için 5 adet tüp alındı.

Düşük düzey serum havuzundan eşit miktarda 1. ve 5. Tüpe konuldu. 1. Tüpe düşük düzey interferan serum havuzunun %10'nunu geçmeyecek şekilde konuldu. 5. Tüpe de aynı miktarda yüksek seviye interferan ilave edildi. 1. ve 5. Tüplerde eşit miktarda alınarak 3. Tüpe konuldu. 1. ve 3. Tüplerden eşit miktarda alınarak 2. Tüpe konuldu. 3. ve 5. Tüplerden eşit miktarda alınarak 4. Tüpe konuldu. Böylece 1. Tüpten 5. Tüpe kadar artan konsantrasyonlarda (%0, %25, %50, %75 ve %100) interferan içeren tüpler elde edildi. Yüksek düzey serum havuzu için de aynı işlemler tekrarlandı. 1. Tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada, 2. Tekrar interferan konsantrasyonu azalan sırada, 3. Tekrar tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada olacak şekilde gerçekleştirildi. Tüm konsantrasyonlarda ve interferanlarda aynı işlem tekrarlanmıştır.

### 3.4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması

Taşıma çalışmasında yüksek ve düşük konsantrasyondaki örnekler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutuldu. Düzenleme şekli aşağıdaki gibidir.

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

Grup 1: D2-D3-D6-D7-D8

Grup 2: D4-D5-D9-D10-D11

Grup 1 düşüklerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, grup 2 yükseklerden sonra gelen düşük numuneleri içermektedir. Grupların ortalamaları ve

standart sapmaları hesaplanır. Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenir (westgard ve ark, 2008).

Taşıma çalışmasında Klozapin için kullanılan konsantrasyonlar;

Düşük konsantrasyon: 250 µg/L

Yüksek konsantrasyon: 625 µg/L'dir.

Klozapin için yukarıdaki konsantrasyonlar kullanılarak taşıma çalışması için gerekli tüpler standart ön işlemlerden geçirilerek, yukarıdaki sıraya göre analiz edildi.

#### **3.4.7. Numune Stabilite Çalışması**

Numune stabilitesini belirlemek için iki farklı hasta numunesi aynı gün içerisinde standart ön işlemlerden geçirilerek çalışıldı ve 7., 14. Ve 21. Günlerde çalışılmak üzere donduruldu. Her çalışma gününde standart ön işlemler yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.8. Dondurma Ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi**

Dondurma ve çözme işleminin Klozapin ölçümüne etkisini belirlemek amacıyla düşük ve yüksek düzey olmak üzere farklı konsantrasyonlarda serum havuzu oluşturuldu. 4 defa dondurup çözme işlemi gerçekleştirildi. Çözdürülen numuneler standart ön işlemlerden geçirilerek analiz edildi ve ölçüm sonuçları kaydedildi.

#### **3.4.9. Matrex Etkisi Çalışması**

Klozapin için matriks etkisi çalışmaları Chambers ve arkadaşlarının yaptığı çalışma protokülüne göre gerçekleştirildi ve onların % matriks etkisi hesaplamasına uygun olarak hesaplandı. Klozapin için 625, 156 ve 78 µg/L'lik standartlar kullanarak gerçekleştirilmiştir.

Bir serum havuzundan Klozapin için 3'er tüp olmak üzere 6 tüp alındı, numune hazırlama protokülüne göre olarak 3 tüpte ön işlemten geçirilmiştir, ön işlemten geçirilen 3 tüp azot gazı altında kurutulup 200 µl %50 asetonitril ile

özöldükten sonra sırayla 200 µl 625, 156 ve 78 µg/L'lik Klozapin standartı eklendi. İyice karıştırılıp, 190 µl vialle alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Aynı analiz içinde Klozapin için herhangi bir ön işlem yapılmadan 3 tüpe 200 µl %50'lik asetonitril ve sırayla 200 µl 625, 156 ve 78 µg/L'lik Klozapin standartı eklendi. İyice karıştırılıp, 190 µl vialle alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir.



#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

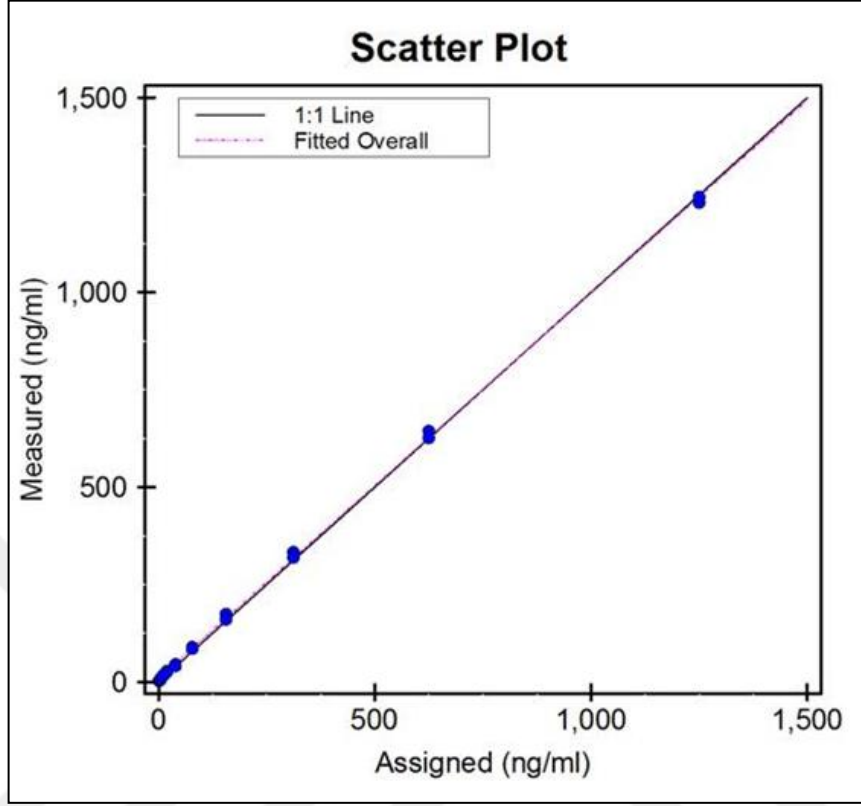
Klozapin için linearite sonuçları Çizelge 4.1 gösterilmektedir.

**Çizelge 4.1** Klozapin linearite verileri.

| Klozapin<br>$\mu\text{g/L}$ | Klozapin<br>1.ölçüm | Klozapin<br>2.ölçüm | Klozapin 1. Ve<br>2. Ölçüm<br>ortalaması | Dilüsyon<br>No | Uygunluk<br>% |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------------|----------------|---------------|
| 1250                        | 1230                | 1238                | 1234                                     | 1              | 98.7          |
| 625                         | 644                 | 626                 | 635                                      | 2              | 101.6         |
| 312                         | 333                 | 320                 | 326                                      | 3              | 104.6         |
| 156                         | 174                 | 160                 | 167                                      | 4              | 107.1         |
| 78                          | 88.9                | 85.2                | 87                                       | 5              | 111.6         |
| 39                          | 45.1                | 40.6                | 42.85                                    | 6              | 109.9         |
| 19                          | 27.6                | 25.3                | 26.45                                    | 7              | 139.2         |
| 9.7                         | 14.5                | 15.1                | 14.8                                     | 8              | 152.6         |
| 4.8                         | 7.62                | 6.2                 | 7.06                                     | 9              | 147.1         |
| 2.4                         | 4.3                 | 3.9                 | 4.1                                      | 10             | 170.8         |
| 1.2                         | 2.5                 | 2.7                 | 2.6                                      | 11             | 216.7         |

Çizelge 4.1’de Klozapinin serum ile 1250  $\mu\text{g/L}$ ’den başlayıp 1.2  $\mu\text{g/L}$ ’ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları görülmektedir. Her bir konsantrasyon çift ölçülüp, ortalamaları alındı. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edildi.

Klozapin linearite grafiği ve sonuçların dağılımları Grafik 4.1’de gösterilmektedir.



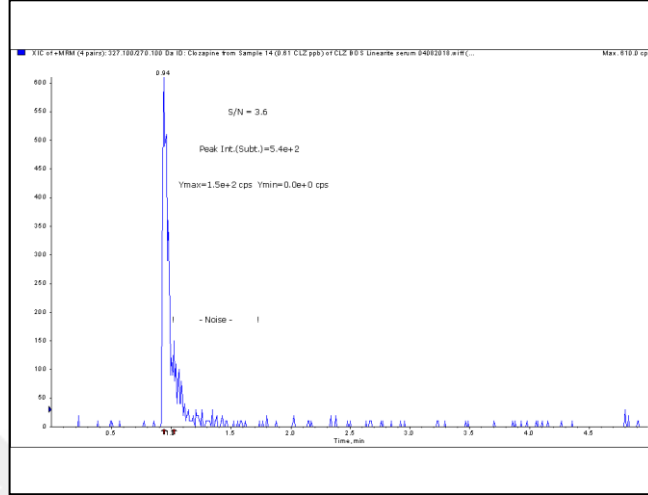
**Grafik 4.1** Klozapin linearite grafiği ve sonuçların dağılımları.

$R^2 = 0.989$  olarak bulundu.

## 4.2. Analitik ölçüm limitleri

### 4.2.2. Limit of Detection

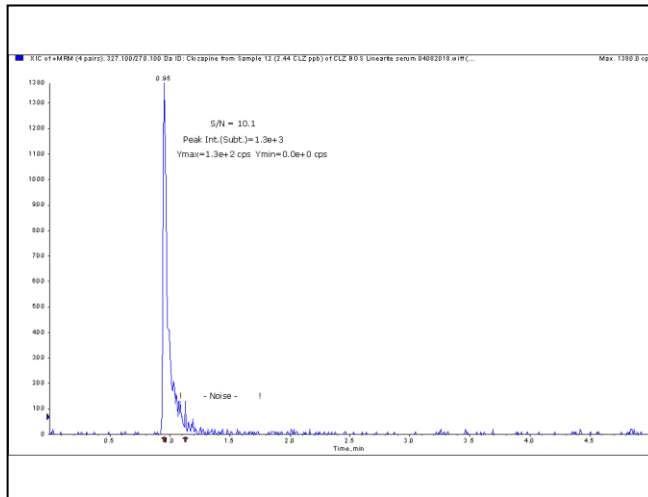
Klozapin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD grafik 4.2'de gösterilmiştir.



**Grafik 4.2** Klozapin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD 0,6 µg/L olarak tespit edilmiştir.

### 4.2.3. Limit of Quantitation

Klozapin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ grafik 4.3de gösterilmiştir.



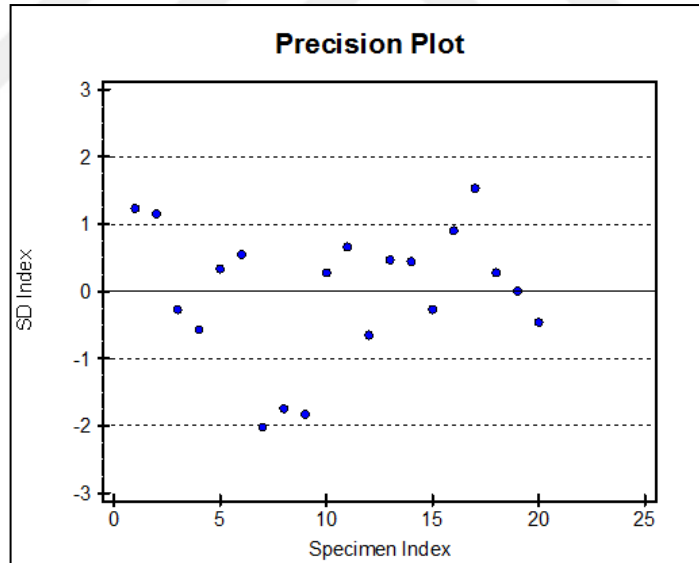
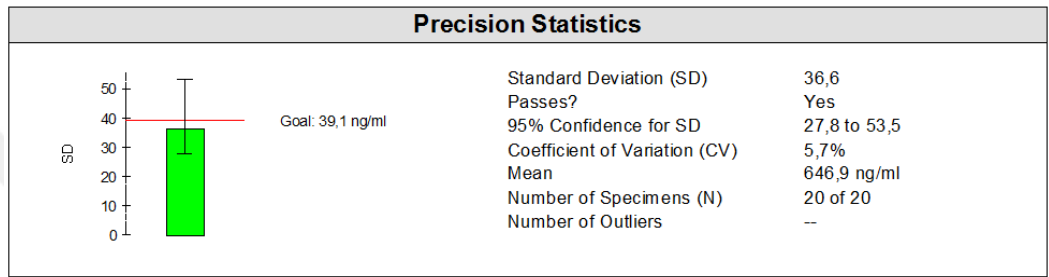
**Grafik 4.3** Klozapin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ 2.44 µg/L olarak tespit edilmiştir.

### 4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması

#### 4.3.1. Klorzapin Çalışma İçi Çalışması

Klorzapin için 625, 250 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ardışık 20 defa okutulmuştur. 625 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonunun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmektedir. Aynı numunenin 2 SD aralığındaki dağılımı grafik 4.4'de gösterilmektedir.

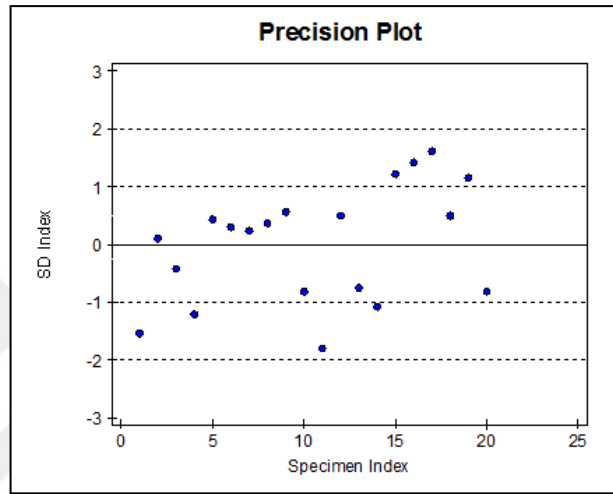
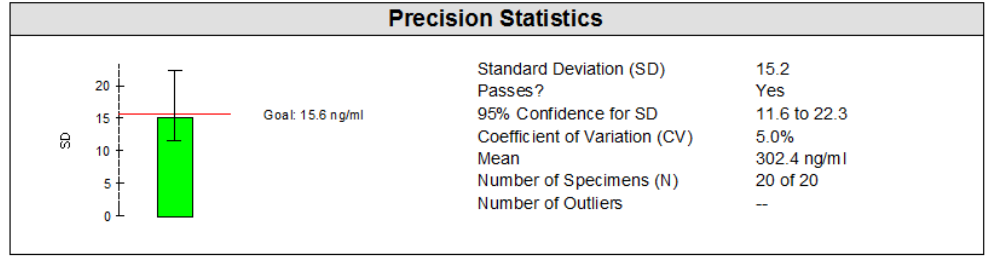
**Çizelge 4.2** 625 µg/L Klorzapin çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.4** 625 µg/L Klorzapin çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

250 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonunun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma Sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmektedir. Aynı numunenin 2 SD aralığındaki dağılımı grafik 4.5'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3** 250 µg/L Klozapin çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.5** 250 µg/L Klozapin çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

625 µg/L'lik ve 250 µg/L'lik Klozapin konsantrasyonlarının gün içi çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4.3'de verilmektedir.

**Çizelge 4.3** Klopapin çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

| Konstrasyon | Ortalama | SD   | CV  |
|-------------|----------|------|-----|
| 625         | 646.9    | 36.6 | 5.7 |
| 250         | 302.4    | 15.2 | 5.0 |

Gün içi kesinlik çalışmasında 625 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 36,6, % CV 5,7, 250 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD: 15,2, % CV: 5,0'dır.

Wesgard'ın websitesinde ( <https://www.westgard.com/clia.htm> ) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 625 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi;  $625 \times 0.25 = 156.25$  µg/L'dir. İzin

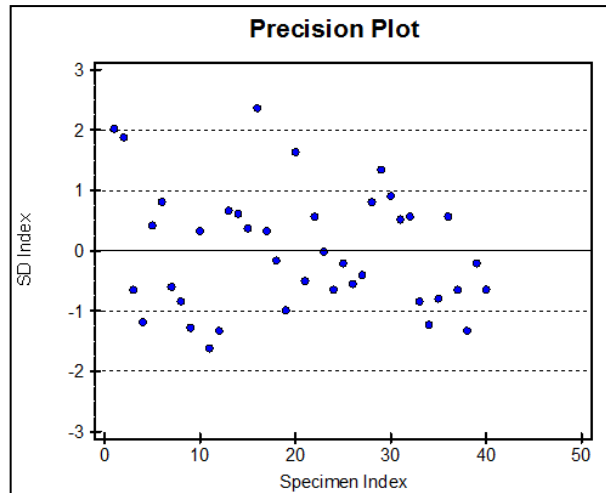
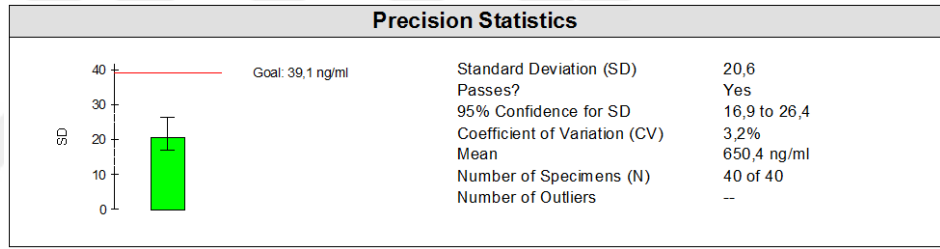
verilen SD:  $156.25 \div 4 = 39.06$ 'dir.  $36.6 < 39.06$  olduğu için, 625 µg/L'lik konsantrasyonda çalışmalar içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

250 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi  $250 \times 0.25 = 62.5$  µg/L'dir. İzin verilen SD:  $62.5 \div 4 = 15.625$ 'tir.  $15.2 < 15.625$  olduğu için 250 µg/L'lik konsantrasyonda çalışmalar içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

#### 4.3.2. Klorzapin Gün İçi Çalışma Arası Çalışması

Klorzapin için 625, 250 µg/L'lik konsantrasyonlar sabah ve akşam olmak üzere aynı çalışma içinde ardışık 20'şer defa okutulmuştur. 625 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.4'da gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı grafik 4.6'da gösterilmektedir.

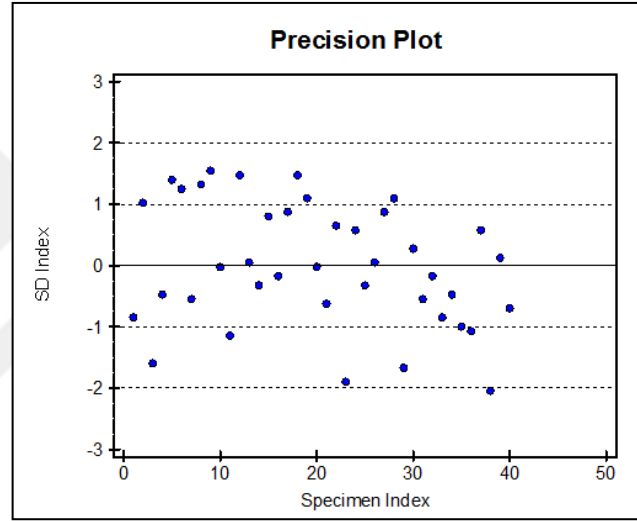
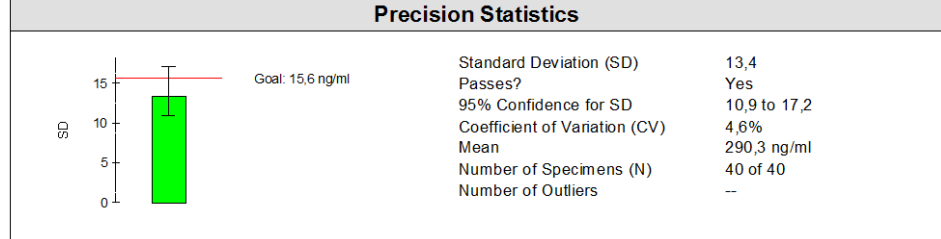
**Çizelge 4.4** 625 µg/L Klorzapin gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.6** 625 µg/L Klorzapin gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

250 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonunun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı grafik 4.7'da gösterilmektedir.

**Çizelge 4.5** 250 µg/L Klorzapin gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.7** 250 µg/L Klorzapin gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

625 µg/L'lik ve 250 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonlarının gün içi çalışma arası tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4. 6'de verilmektedir.

**Çizelge 4.6** Klorzapin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

| Konstrasyon | Ortalama | SD   | CV  |
|-------------|----------|------|-----|
| 625         | 650.4    | 20.6 | 3.2 |
| 250         | 290.3    | 13.4 | 4.6 |

Gün içi kesinlik çalışmasında 625 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 20.6, % CV 3.2, 250 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD: 13.4, % CV: 4.6dır.

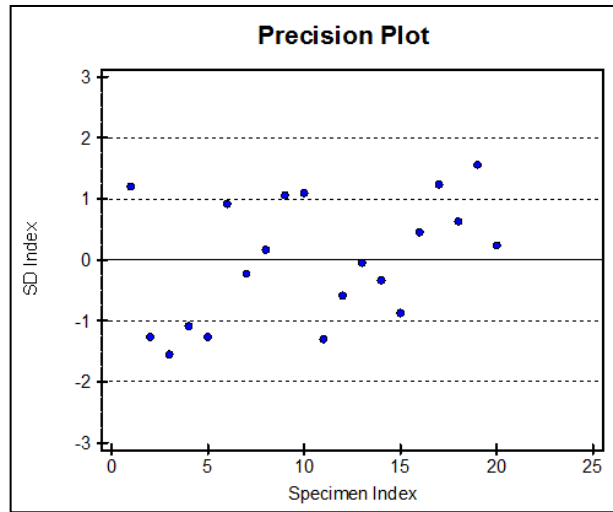
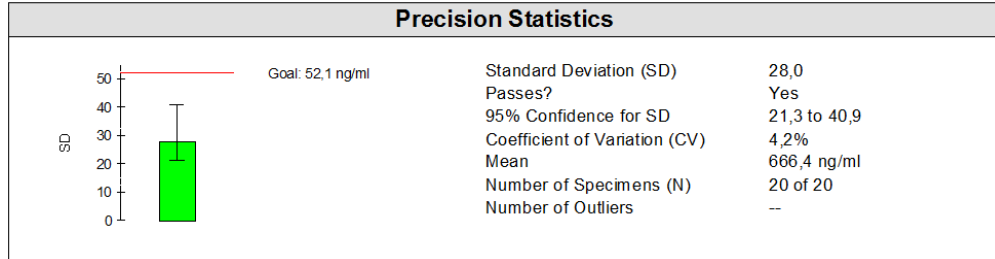
Wesgard'ın websitesinde ( <https://www.westgard.com/clia.htm> ) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 625 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi;  $625 \times 0.25 = 156.25$  µg/L'dir. İzin verilen SD:  $156.25 \div 4 = 39.06$ 'dır.  $20.6 < 39.06$  olduğu için, 625 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

250 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi  $250 \times 0.25 = 62.5$  µg/L'dir. İzin verilen SD:  $62.5 \div 4 = 15.625$ 'tir.  $13.4 < 15.625$  olduğu için 250 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

#### 4.3.3. Klorzapin Günler Arası Çalışması

Klorzapin için 625 ve 250 µg/L'lik konsantrasyonlar 4 gün boyunca günde 5 farklı numune birer kez okutuldu günler arası tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. 625 µg/L'lik Klorzapin konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı grafik 4.7'de gösterilmektedir.

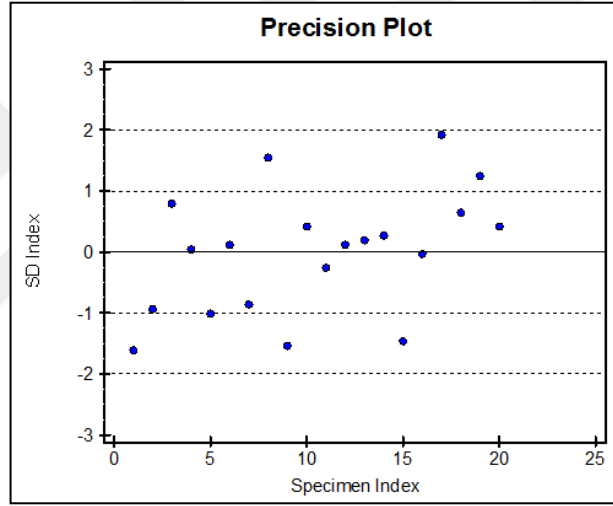
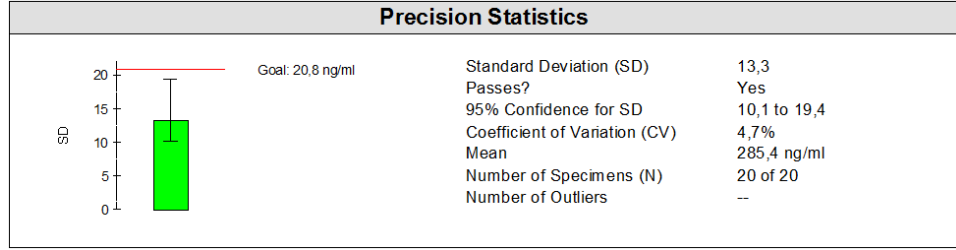
**Çizelge 4.7** 625 µg/L Klorzapin günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.7** 625 µg/L Klorzapin günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

250 µg/L’lik Klorzapin konsantrasyonunun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 4.8’de gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı grafik 4.8’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.8** 250 µg/L Klorzapin günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



**Grafik 4.8** 250 µg/L Klorzapin günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

625 µg/L’lik ve 250 µg/L’lik Klorzapin konsantrasyonlarının günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4. 9’de verilmektedir.

**Çizelge 4.9** Klorzapin günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

| Konstrasyon | Ortalama | SD   | CV  |
|-------------|----------|------|-----|
| 625         | 666.4    | 28.0 | 4.2 |
| 250         | 285.4    | 13.3 | 4.7 |

Günler arası kesinlik çalışmasında 625 µg/L’lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 28.0, % CV 4.2, 250 µg/L’lik konsantrasyonda elde edilen SD: 13.3, % CV: 4.7dir.

Westgard'ın websitesinde (<https://www.westgard.com/clia.htm>) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 625 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi;  $625 \times 0.25 = 156.25$  µg/L'dir. İzin verilen SD:  $156.25 \div 3 = 52.08$ 'dir.  $28.0 < 52.08$  olduğu için, 625 µg/L'lik konsantrasyonda günler arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

250 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi  $250 \times 0.25 = 62.5$  µg/L'dir. İzin verilen SD:  $62.5 \div 3 = 20.8$ 'dir.  $13.3 < 20.8$  olduğu için 250 µg/L'lik konsantrasyonda günler arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

#### 4.4. Geri Kazanımı Çalışması

Klozapin için 625, 312 ve 156 µg/L'lik standartlar ile yaptığımız geri elde çalışmasının verimleri Çizelge 4.10.'da gösterilmektedir. 100'de geri elde edilen oran ise geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.10** Klozapin geri elde çalışma verimleri.

|                                             | Konstrasyon | Geri elde edilen | % Recovery |
|---------------------------------------------|-------------|------------------|------------|
| 100 µl Klozapin 625 µg/L+<br>900 um serum   | 62,5        | 61.1             | %97.76     |
| 100 µl Klozapin 312 µg/L+<br>900 µl serum   | 31,2        | 30.3             | %97.11     |
| 100 µl Klozapin 156 µg/lL +<br>900 µl serum | 15,6        | 20.3             | %130       |

#### 4.5. İnterferans Çalışması

Klozapin, Olanzapin ile yaptığımız interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.11** Klozapin, Olanzapin ile interferans çalışma.

| Numune adı | Düşük düzeyler $\mu\text{g/L}$ | Numune numarası | Yüksek düzeyler $\mu\text{g/L}$ |
|------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| Serum      | 260                            | Serum           | 680                             |
| D1         | 288                            | Y1              | 648                             |
| D1         | 278                            | Y1              | 637                             |
| D1         | 270                            | Y1              | 629                             |
| D2         | 264                            | Y2              | 654                             |
| D2         | 259                            | Y2              | 674                             |
| D2         | 240                            | Y2              | 580                             |
| D3         | 277                            | Y3              | 678                             |
| D3         | 281                            | Y3              | 682                             |
| D3         | 254                            | Y3              | 633                             |
| D4         | 258                            | Y4              | 710                             |
| D4         | 270                            | Y4              | 685                             |
| D4         | 240                            | Y4              | 701                             |
| D5         | 293                            | Y5              | 654                             |
| D5         | 274                            | Y5              | 662                             |
| D5         | 251                            | Y5              | 625                             |

Düşük ve yüksek serum havuzundaki en yüksek interferan içeren tüp okumalarının ortalaması alınıp % biasları hesaplandı. Y5 için %-4.85 , D5 için % 4.87 olarak tespit edilmiştir.

#### 4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması

Klozapin için yaptığımız taşıma çalışma verimleri Çizelge 4.12’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.12** Klozapin taşıma çalışmasının sonuçları.

| Carryover Analysis |       |             |      |
|--------------------|-------|-------------|------|
| High-Low Mean      | 318.0 | Error Limit | 90.1 |
| Low-Low Mean       | 339.4 | Passes?     | Yes  |
| Carryover          | -21.4 |             |      |

| Experimental Results |        |                 |                  |
|----------------------|--------|-----------------|------------------|
| Sample               | Result | Low-Low Results | High-Low Results |
| L1                   | 306    |                 |                  |
| L2                   | 327    | 327             |                  |
| L3                   | 321    | 321             |                  |
| H1                   | 755    |                 |                  |
| H2                   | 783    |                 |                  |
| L4                   | 348    |                 | 348              |
| H3                   | 858    |                 |                  |
| H4                   | 732    |                 |                  |
| L5                   | 363    |                 | 363              |
| L6                   | 392    | 392             |                  |
| L7                   | 321    | 321             |                  |
| L8                   | 336    | 336             |                  |
| H5                   | 717    |                 |                  |
| H6                   | 664    |                 |                  |
| L9                   | 329    |                 | 329              |
| H7                   | 692    |                 |                  |
| H8                   | 763    |                 |                  |
| L10                  | 258    |                 | 258              |
| H9                   | 765    |                 |                  |
| H10                  | 646    |                 |                  |
| L11                  | 292    |                 | 292              |
| Mean                 |        | 339.4           | 318.0            |
| SD                   |        | 30.0            | 42.8             |

| Supporting Data |             |
|-----------------|-------------|
| Units:          | ng/ml       |
| Analyst:        | Klozapin    |
| Expt. Date:     | 31 Aug 2018 |
| Low Conc:       | 250         |
| High Conc:      | 625         |
| Comment:        | Tasima      |

Klozapin için yaptığımız taşınma çalışması ep-evaluator release 8 analizi ile değerlendirildiğinde -21.4 olarak tespit edilmiştir.

#### 4.7. Numune Stabilite Çalışması

Klozapin numune stabilitesinin tespiti için hasta numuneleri ile yaptığımız çalışmaların sonuçları ve hesaplanan % biaslar Çizelge 4.13'te gösterilmektedir.

**Çizelge 4.13** Numune stabilite sonuçları ve % biaslar.

| 1.okuma  | 2.okuma   | 3.okuma   | 4.okuma   | 2.<br>Okumanın<br>% biası | 3.<br>Okumanın<br>% biası | 4.<br>Okumanın<br>% biası |
|----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 873 ug/l | 758 ug/l  | 853 ug/l  | 744 ug/l  | -13.17                    | -2.29                     | -14,77                    |
| 38 ug/l  | 44.1 ug/l | 37.6 ug/l | 33.7 ug/l | 16.05                     | -1.05                     | -11.3                     |

#### 4.8. Dondurma Çözme Etkisi Çalışması

Klozapin için dondurma çözmenin etkisini belirlemek için yaptığımız çalışmanın verimleri ve ölçümlerin arasında ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar Çizelge 4.14'te gösterilmektedir.

**Çizelge 4.14** Klozapin dondurma çözme etkisi çalışma verimleri ve ölçümlerin arası % biaslar.

| Verilen<br>konstrasyonu | 1.okuma | 2.okuma | 3.okuma | 4.okuma |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 625 µg/L                | 634     | 629     | 623     | 606     |
| 250 µg/L                | 270     | 245     | 266     | 227     |
| 625 µg/L<br>%bias       | -       | -0.78   | -1.73   | -4,41   |
| 250 µg/L<br>%bias       | -       | -9.25   | -1.48   | -15.9   |

#### 4.9. Matriks Etkisi Çalışması

Klozapin için yaptığımız matriks etkisi çalışma sonuçları Çizelge 4.15’ te görülmektedir.

**Çizelge 4.15** Klozapin matriks etkisi çalışma sonuçları.

|                                               | Pik alanı          | % Matriks etkisi |
|-----------------------------------------------|--------------------|------------------|
| Mobil faz+ 625 µg/L<br>Klozapin standartı     | $2.59 \times 10^5$ | 4.24             |
| Serum havuzu + 625 µg/L<br>Klozapin standartı | $2.7 \times 10^5$  |                  |
| Mobil faz+ 156 µg/L<br>Klozapin standartı     | $5.87 \times 10^4$ | -12.09           |
| Serum havuzu + 156 µg/L<br>Klozapin standartı | $5.16 \times 10^4$ |                  |
| Mobil faz+ 78 µg/L<br>Klozapin standartı      | $2.97 \times 10^4$ | 16.49            |
| Serum havuzu + 78 µg/L<br>Klozapin standartı  | $3.46 \times 10^4$ |                  |

% Matriks etkisi =(Ektrakte edilen numunenin pik alanı / Ektrakte edilmeyen numunenin pik alanı -1)×100

Klozapin % matriks etkisi yukarıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$625 \mu\text{g/L için \% matriks etkisi}=(2.7 \times 10^5 \times 10^5 / 2.59 \times 10^5 -1) \times 100= 4.24$$

$$156 \mu\text{g/L için \% matriks etkisi}=(5.16 \times 10^4 \times 10^4 / 5.87 \times 10^4 -1) \times 100= -12.09$$

$$78 \mu\text{g/L için \% matriks etkisi}=(3.46 \times 10^3 / 2.97 \times 10^3 -1) \times 100= 16.49$$

## 5. TARTIŞMA

Klinik pratikte, Klozapinin şizofreni semptomlarının tedavisinde büyük bir rol oynamaktadır ancak Klozapinin hastayı etkileyen çok kötü yan etkileri olduğu ve bu yan etkileri nedeniyle Klozapin çok doktorlar tarafından tercih edilmemektedir.

Selçuk üniversitesi tıp fakültesinde bulunan ruh sağlığı anabilim dalı öğretim üyeleri tarafından Klozapin düzey ölçümleri talep edilmekte ve düzey ölçümünün önemli olduğu ilaç grubuna girdiği bilinmektedir.

İlaç düzeyi ölçümünde hassasiyet çok önemli olduğundan kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olmalıdır. Analitik interferansın azaltılması, doğruluğun artırılması ve analiz süresinin kısaltılması amacıyla serum Klozapin düzeylerinin ölçümü için, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS)'te yeni bir ölçüm metodu geliştirerek, rutin ölçümlerde kullanmayı planlamaktayız.

Çalışmamızda LC-MS/MS'te Klozapin için metot validasyon CLSI kurallarına göre gerçekleştirilmiştir. Saf metanolda çözölmüş klozapin tablet leri, serum ile seri dilsyon yapılan düzeyler, 48 hasta numuneleri bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Metot validasyonu çalışmasında en yüksek intensiye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırayla Klozapin için 327.100ve 270.100, İnternal standart için 152.100 ve 65.100 olarak belirlenmiştir. İonspray voltage (IS) 5000 volt, sıcaklık 350 °C, total flow 1.000 ml/dk en yüksek intensitenin elde edildiği cihaz parametreleridir.

Metot validasyon çalışmasında klozapim için 1250-1.2 µg/L aralığı lineer bulunuldu, linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) değeri 0,989 olarak hesaplanmıştır. Klozapin için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0,6 µg/L, kantitasyon limiti 2.4 µg/ Lolarak tespit edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 625 µg/L, 250 µg/L'lik Klozapin serum standartları ile gün içi çalışma içi, gün içi çalışma arası ve günlerarası tekeralanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen %CV'leri sırasıyla %5.7, %5.0 olarak bulunmuş ve bu konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin içindedir. Gün içi çalışma arası

tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen %CV'leri sırasıyla %3.2, %4.6 olarak bulundu ve bu konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin içindedir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen %CV'ler sırasıyla %4.2, %4.7 %olarak bulunmuştur ve bütün konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin içindedir.

Geri elde çalışmasında 625 µg/l, 312 µg/l, 156 µg/Lkonsantrasyonunda üç Klozapin serum standardı kullanılmıştır. Geri elde % değerleri sırasıyla %97.76, %97.11, %130'tür. Üçüncü numunede geri eldede bozulma bulunmuştur, Klozapinin serumdeki terapötik aralığı 350 – 600 µg/Lolduğundan dolayı düşük konsantrasyonlara dikkat edilmedi.

Klozapin, Olanzapin ile interferans çalışması yapılmıştır. Klozapinin iki farklı düzeyleri 625 µg/L ve 250 µg/L elde edilen bias değerleri sırayla %-4.85 % 4.87dir.

Taşıma çalışması Sonuç EP-evaluator analizi ile değerlendirildiğinde -21.4 olarak tespit edilmiştir

Nunumune stabilitesinin tespitinde iki farklı hasta numuneleri kullanıldı, yapılan çalışmada ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar 7. Gününde %-13.17 ve %16.05 , 14. Gününde %-2.29 ve %-1.05, 21. Gününde %-14,77ve %-11.3 olarak bulunmuştur.

Dondurma-Çözme etkisini belirlemek için 625 µg/L ve 250 µg/L iki farklı konsantrasyonlar ile yapılan çalışmada ilk ölçüme göre hesaplandı, 625 µg/Lhesaplanan % biaslar 2.don-çöz analiz için %-0,78 3.don-çöz analiz için %-1, 73 ve 4.don-çöz analiz için %-4,41olarak bulunmuştur, 250 µg/L ise hesaplanan % biaslar 2.don-çöz analiz için %-9.25 3.don-çöz analiz için %-1. 48 ve 4.don-çöz analiz için %-15.9 olarak bulunmuştur.

Matriks etkisinin çalışmasında üç farklı düzey kullanıldı (625, 156, 78 µg/L) elde edilen CV'leri sırasıyla 4.24, -12.09, 16.49'dur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klozapin ölçümü psikiyatrik bölümünden talep edildiği ve önemli bir ilaç grubuna girdiği için yaptığımız çalışma büyük bir önem taşımaktadır. Yaptığımız çalışma CLSI protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi ve elde edilen çalışma sonuçları hesapladıktan sonra bu metot biyokimya bölümünde rutin olarak kullanabileceğimizi düşünmekteyiz.



## KAYNAKÇA

Alessi-Severini, S. W. a. S., 2014. *BMC Psychiatry*, Cilt 14: 102..

Andreasen, N. a. O. S., 1983. Negative v Positive Schizophrenia. Definition and Validation.. *Arch. Gen. Psychiatry*, pp. 9, 789-794..

Anthony J. Trevor, B. G. K. M. K.-H., 2015. *KATZUNG & TREVORS Pharmacology Examination & Board Review 11th Edition*. s.l.:s.n.

Auwärter, A. W. & N. T. & M. H.-C. & V., 2011. sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid–liquid extraction work-up.. *Anal Bioanal Chem*, Cilt 400:737–746 DOI 10.1007/s00216-011-4831-8.

Bruns, C. B. D., 2007. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry Chemistry 6th Edition*. s.l.:s.n.

Danielle S. Fisher, S. J. P. S. A. H. L. C. P. E. M. R. J. F., 2013. LC-MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid, and haemolysed whole blood.. *Forensic Science International*, Cilt 229, p. 145–150.

Flanagan., L. C. & S. L. B. & S. A. H. & R. J., 2013. A novel approach to quantitative LC-MS/MS: therapeutic drug monitoring of clozapine and norclozapine using isotopic internal calibration.. *Anal Bioanal Chem*, Cilt 405:9455–9466 DOI 10.1007/s00216-013-7361-8.

Health, N. I. o. M., SCHIZOPHRENIA. *NIH Publication No. 15-3517*.

J., C., 2007 Mar. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis.. *Hist Psychiatry*, Cilt 18(1):39-60..

KIM T. MUESER, D. V. J., 2011. *CLINICAL HANDBOOK OF SCHIZOPHRENIA*.. s.l.:s.n.

Lindsley, C. J. W. a. C. W., 2013 Jul 17; . Classics in Chemical Neuroscience: Clozapine. *ACS Chem Neurosci*, Cilt 4(7): 1018–1025..

M.C. Mauri, S. P. M. M. A. C. F. D. C. D. P., 2014. CLINICAL PHARMACOLOGY OF ATYPICAL ANTIPSYCHOTICS: An Update. *EXCLI Journal* 2014;13:1163-1191 – ISSN 1611-2156.

Michael W. Jann, S. R. G. E. C. G. a. W.-H. C., tarih yok Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clozapine. *Clin. Pharmacokinet.* 24 (2): 161-176. 1993 .

Mijeong Kanga, b. E. K. T. E. W. G. B. Y. L., 2017. Reliable clinical serum analysis with reusable electrochemical sensor: Toward point-of-care measurement of the antipsychotic medication Clozapine.. *Biosensors and Bioelectronics*, Cilt 95 , p. 55–59.

Philip Seeman, M. P., 2002. Atypical Antipsychotics: Mechanism of Action. *WCanJ Psychiatry*, Vol 47, No 1,.

Seeman, P., 2014 . Clozapine, a Fast-Off-D2 Antipsychotic. *ACS Chem Neurosci.*, Cilt 15;5(1):24-9..

Stein, D. J., 2013. *Textbook of Psychiatry*. s.l.:s.n.

Tietz, N. (., 2006. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. s.l.:diagnostics-/[ed. by] Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns: St. Louis, Mo: Elsevier Saunders..



## Ekler

### EK A: Etik Kurul Raporu

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | T.C.<br>SELÇUK ÜNİVERSİTESİ<br>TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI |
| GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                        |
| Toplantı Sayısı: 2017/18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Toplantı Tarihi : 01.11.2017                           |
| <p>Karar Sayısı 2017/308 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ali ÜNLÜ'nün "Biyolojik sıvılarda Klozapin ölçümü için LC-MS/MS yöntem kurulması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 19.10.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.</p> <p>Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Ali ÜNLÜ'nün "Biyolojik sıvılarda Klozapin ölçümü için LC-MS/MS yöntem kurulması" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.</p> |                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                        |

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Karam GHARAB  
Doğum Yeri : Bağdat / IRAK  
Medeni Hali : Evli  
E-posta : [karammazin@gmail.com](mailto:karammazin@gmail.com)  
Tel : +905313286824  
Adresi : Bosna Hersek Mahallesi, Dikme Sok, Rahmet sitesi, 21/40  
Selçuklu/KONYA

### Eğitim

Lise : Al-manour lisesi, bağdat / IRAK  
Lisans : Biyoteknoloji, University Of Technology  
Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

### Yabancı Dil

Arapça ve İngilizce

### Katıldığı Kurslar ve Eğitimler

Tıbbi Bilimlerde Lisansüstü Öğrencilere Yönelik Bilimsel Araştırma ve Proje Hazırlama Eğitimi

### Katıldığı Sempozyum&Kongreler

Kök Hücre Bölge Toplantıları-1  
XXVIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum

### İş deneyimi

AL-Sama Bilgisayar ofisi (1 yıl 2012-2013)  
Eli Lilly ilac firması (1 yıl 2013-2014) – medikal temsilci